

Université de Sherbrooke

**Effet différentiel de la costimulation par la molécule B7.2
sur les lymphocytes T CD4⁺ *versus* T CD8⁺.**

Par

Jonathan Nicol

Programme d'immunologie

**Mémoire présenté à la faculté de médecine en vue de
l'obtention du
grade Maître en Science (M.Sc)**

Avril 2002



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-74490-6

Canada

Table des matières

	Pages
Table des matières.....	III
Liste des tableaux.....	VI
Liste des figures.....	VII
Liste des abréviations, sigles et symboles.....	IX
Résumé.....	2
1. Introduction.....	4
1.1 L'activation des lymphocytes T.....	4
1.2 Le système B7/CD28/CTLA-4.....	7
1.2.1 CD28.....	7
1.2.2 CTLA-4.....	9
1.2.3 Les molécules de la famille B7.....	10
1.3 La tolérance des lymphocytes T.....	12
1.3.1 La tolérance centrale.....	13
1.3.2 La tolérance périphérique.....	13
1.4 Les lymphocytes T cytotoxiques.....	15
1.4.1 Les lymphocytes T CD28 ⁺ naïfs, mémoires et effecteurs.....	15

1.5	Projet de recherche.....	20
2.	Matériel et Méthodes.....	23
2.1	Génotype des souris B7.2 transgéniques.....	23
2.2	Prélèvement et préparation des organes lymphoïdes.....	24
2.3	Comptage des cellules.....	25
2.4	Marquages des cellules avec anticorps fluorescents.....	26
2.5	Perfusion de souris.....	27
2.6	Tri des lymphocytes T CD8 ⁺ par sélection négative sur colonne magnétique.....	28
2.7	Extraction de l'ARNm.....	31
2.8	Quantification de l'ARNm.....	32
2.9	Synthèse du cDNA avec de la SuperScript II.....	33
2.10	Conditions de PCR.....	34
2.11	Électrophorèse sur gel d'agarose.....	35
2.12	Marquage du CTLA-4 intracellulaire.....	36
2.13	Détection d'IFN γ intracellulaire.....	37
2.14	Déplétion <i>in vivo</i> des lymphocytes T CD4 ⁺	38
3.	Résultats.....	39
3.1	Élimination des lymphocytes B par les cellules T CD4 ⁺ et T CD8 ⁺ dans les souris B7.2 transgéniques.....	39

3.2	Phénotype des lymphocytes B périphériques des souris B7.2 Tg déficientes en CMH de classe II.....	44
3.3	Expansion des lymphocytes T CD8⁺ dans les souris B7.2 Tg déficientes en CMH de classe II.....	47
3.4	Phénotype des lymphocytes T dans les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH de classe I et CMH de classe II.....	48
3.5	État fonctionnel des lymphocytes T CD8⁺	54
3.6	Infiltration des lymphocytes T CD8⁺ B7.2 Tg, au niveau des organes.....	57
3.7	Expansion polyclonal des lymphocytes T CD8⁺	59
3.8	Expansion périphérique des lymphocytes T CD8⁺	63
3.9	Expression du CTLA-4 sur les lymphocytes T CD8⁺ B7.2 Tg.....	65
3.10	Souris B7.2low déficientes dans l'expression des molécules du CMH de classe II.....	67
3.11	Déplétion des lymphocytes T CD4⁺ chez les souris B7.2 Tg de la lignée 27.....	73
4.	Discussion et conclusion.....	76
5.	Remerciements.....	93
6.	Annexe.....	94
7.	Références.....	96

Liste des Tableaux

Pages

Tableau 1.	Différents marqueurs de surface retrouvés chez les lymphocytes	
	T CD8 ⁺ au stade naïf, mémoire et effecteur.....	19
Tableau 2.	Expansion polyclonal des lymphocytes T CD8 ⁺ au niveau de la	
	rate des souris CMH II -/- de la lignée B7.2mod.....	61

Liste des Figures

	Pages
Figure 1. Différentes molécules impliquées dans la formation de la synapse immune.....	6
Figure 2. Montage de la colonne magnétique pour déplétion des lymphocytes B chez les souris CMH II ^{-/-} de la lignée B7.2mod.....	30
Figure 3. Analyse des lymphocytes B et des lymphocytes T au niveau de la moelle osseuse.....	41
Figure 4. Analyse des lymphocytes B et des lymphocytes T au niveau de la rate.....	42
Figure 5. Analyse des lymphocytes B et des lymphocytes T au niveau des ganglions périphériques.....	43
Figure 6. Profil représentatif des lymphocytes B au niveau de la rate chez les souris CMH II ^{-/-} de la lignée B7.2mod.....	45
Figure 7. Profil représentatif des lymphocytes B au niveau des ganglions périphériques chez les souris CMH II ^{-/-} de la lignée B7.2mod.....	46
Figure 8. Phénotype représentatif des lymphocytes T CD4 ⁺ de la rate des souris CMH I ^{-/-} de la lignée B7.2mod.....	51
Figure 9. Phénotype représentatif des lymphocytes T CD8 ⁺ de la rate des souris CMH II ^{-/-} de la lignée B7.2mod.....	52
Figure 10. Phénotype représentatif des lymphocytes T CD8 ⁺ des ganglions périphériques des souris CMH II ^{-/-} de la lignée B7.2mod.....	53
Figure 11. RT-PCR (perforine, FasL, Granzyme B, INF γ et GAPDH) sur les lymphocytes T CD8 ⁺ de la rate, trié par sélection négative sur colonne magnétique, des souris CMH II ^{-/-} de la lignée B7.2mod.....	55
Figure 12. Profil représentatif de la détection d'INF γ intracellulaire chez les lymphocytes T CD8 ⁺ de la rate des souris CMH II ^{-/-} de la lignée B7.2mod.....	56

Figure 13.	Détection de CD8 par RT-PCR sur différents organes des souris CMH II $-/-$ de la lignée B7.2mod.....	58
Figure 14.	Expression des chaînes V β s chez les lymphocytes T CD8 $^{+}$ dans la rate des souris CMH II $-/-$ de la lignée B7.2mod.....	62
Figure 15.	Profil représentatif des lymphocytes T CD4 $^{+}$ et des lymphocytes T CD8 $^{+}$ dans le thymus des souris CMH II $-/-$ de la lignée B7.2mod...	64
Figure 16.	Profil représentatif de l'expression du CTLA-4 sur les lymphocytes T CD8 $^{+}$ de la rate des souris CMH II $-/-$ de la lignée B7.2mod.....	66
Figure 17.	Analyse du nombre absolu des lymphocytes B et des lymphocytes T CD8 $^{+}$ au niveau de la rate chez les souris CMH II $-/-$ de la lignée B7.2low.....	69
Figure 18.	Phénotype représentatif des lymphocytes T CD8 $^{+}$ de la rate des souris CMH II $-/-$ de la lignée B7.2low.....	70
Figure 19.	Profil représentatif de la détection d'IFN γ intracellulaire chez les lymphocytes T CD8 $^{+}$ de la rate des souris CMH II $-/-$ de la lignée B7.2low.....	71
Figure 20.	Profil représentatif de l'expression du CTLA-4 sur les lymphocytes T CD8 $^{+}$ de la rate des souris CMH II $-/-$ de la lignée B7.2low.....	72
Figure 21.	Phénotype représentatif des lymphocytes T des souris B7.2mod suite à la déplétion <i>in vivo</i> des lymphocytes T CD4 $^{+}$	75
Figure 22.	Modèle hypothétique du rôle des lymphocytes T CD4 $^{+}$, CD25 $^{+}$ immunorégulateurs dans la tolérance périphérique suite à l'activation des lymphocytes T CD8 $^{+}$ des souris B7.2Tg face à des peptides du soi.....	87
Figure 23.	Modèle hypothétique de l'effet différentiel de la liaison de la molécule B7.2 exprimée chez les lymphocytes T avec leurs récepteurs le CD28 et le CTLA-4.....	90

Liste des abréviations, sigles et symboles

ADCC :	Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante d'anticorps (antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity)
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
B7.2low :	B7.2 exprimé faiblement
B7.2mod :	B7.2 exprimé modérément
B7.2hi :	B7.2 exprimé modérément à fortement
BCR :	Récepteur des cellules B (B cell receptor)
BSA :	Albumine sérique bovine
CD :	Groupe de différenciation (cluster differentiation)
cDNA :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA :	Cellule présentatrice d'antigènes
CTLA-4 :	Antigène 4 associé au lymphocyte T cytotoxique (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4)
Ctrl :	Contrôle
Cyc :	Cychrome
D.O :	Densité optique
FasL :	Fas ligand
Facs :	Fascan
Fc :	Portion constante de la chaîne lourde des immunoglobulines
FITC :	Fluorescéine isothiocyanate
IL :	Interleukine
PBS :	Tampon phosphate/saline
PCR :	Réaction de polymérase en chaîne (PCR)
PE :	Phyto-érythrine
PFA :	Paraformaldéhydes
rpm :	Révolution par minute
SA :	Streptavidine
SNC :	Système nerveux central
TCR :	Récepteur des cellules T (T cell receptor)
Tg :	Transgénique
Th :	Lymphocyte T auxiliaire
V β :	Chaîne variable beta du TCR

Université de Sherbrooke

**Effet différentiel de la costimulation par la molécule B7.2
sur les lymphocytes T CD4⁺ *versus* T CD8⁺.**

Par
Jonathan Nicol
Programme d'immunologie

Mémoire présenté à la faculté de médecine en vue de l'obtention du
grade Maître en Science (M.Sc)

Résumé

Dans le but de mieux comprendre le rôle *in vivo* de la molécule B7.2 dans la réponse immune, un modèle de souris transgénique (Tg) exprimant de façon constitutive B7.2 sur les lymphocytes B et T a été généré. Il a été démontré que l'expression constitutive de B7.2 sur les lymphocytes B mène à leur élimination par les lymphocytes T (Fournier et al., 1997; Van Parijs., et al 1997). Afin de déterminer quelle population de lymphocyte T (T CD4⁺ et/ou T CD8⁺) est responsable de l'élimination des lymphocytes B exprimant de façon constitutive la molécule B7.2, nous avons généré des souris B7.2 Tg déficientes en lymphocytes T CD4⁺ (CMH II déficientes) et déficientes en lymphocytes T CD8⁺ (CMH I déficientes). Nos analyses ont démontré, que les deux populations de lymphocytes T sont capables d'éliminer les lymphocytes B B7.2Tg malgré une plus grande efficacité d'élimination pour les lymphocytes T CD4⁺. Un phénomène très intéressant a été observé uniquement chez les souris B7.2Tg déficientes au niveau du CMH II. Chez ces souris, les lymphocytes T CD8⁺ subissent une grande expansion dans

les organes lymphoïdes périphériques (la moelle osseuse, la rate et les ganglions périphériques). Cette expansion n'est pas apparente au niveau du thymus suggérant que ce phénomène est un événement post-thymique. Dans la rate, l'expansion est accompagnée par un phénotype mémoire pour la quasi totalité des lymphocytes T CD8⁺ soit : CD44^{élevé}, CD62-L^{faible}, CD45RB^{modéré} et IL-2Rβ^{modéré}. On observe également une diminution de l'expression du CD8, TCR, et du CD28. L'analyse de l'expression des chaînes Vβs du TCR démontre qu'il s'agit d'une expansion polyclonale favorisant certains clones comme le Vβ 8.3. Ces lymphocytes T CD8⁺ possèdent également tout le bagage cytotoxique comme retrouvé chez des cellules effectrices. De plus, on retrouve de l'infiltration de lymphocytes T CD8⁺ au niveau du système nerveux central (SNC). Finalement, d'autres analyses nous démontrent que l'expansion des lymphocytes T CD8⁺ est due à l'expression de la molécule B7.2 sur les lymphocytes T CD8⁺, plutôt que de l'élimination des lymphocytes B. Tous les phénomènes décrits chez les lymphocytes T CD8⁺ des souris B7.2Tg, CMH II déficientes sont absents chez les lymphocytes T CD4⁺ des souris B7.2Tg, CMH I déficientes. Ces résultats nous portent donc à croire qu'il pourrait exister un effet différentiel suite à la costimulation par la molécule B7.2 chez les lymphocytes T CD8⁺ vs T CD4⁺ et que la stimulation dépendante de B7.2/(CD28/CTLA-4) pourrait jouer un rôle important dans l'homéostasie des lymphocytes T CD8⁺ en périphérie.

1. Introduction

1.1 L'activation des lymphocytes T

Le développement d'une réponse immunitaire adaptative efficace requiert l'activation complète des lymphocytes T. Le récepteur à l'antigène du lymphocyte T (TCR) doit reconnaître un peptide antigénique présenté en association avec une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). L'engagement du TCR au complexe peptide antigénique/CMH n'est pas suffisant pour induire la prolifération et le développement des fonctions effectrices des lymphocytes T naïfs. L'activation complète des lymphocytes T nécessite un deuxième signal, dit de costimulation (Schwartz, 1990). Ce signal de costimulation provient de la liaison de molécules exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA) avec leurs récepteurs présents à la surface des lymphocytes T. Les deux signaux sont acheminés ainsi aux lymphocytes T dans le contexte de la synapse immune (**Figure 1**) (Grakoui et al., 1999) et permettent une activation complète des lymphocytes T. Lorsqu'un lymphocyte T est stimulé via son TCR en absence de signal de costimulation, il devient anergique, c'est à dire qu'il est incapable de proliférer et de se différencier en cellule effectrice, même s'il est stimulé de nouveau dans des conditions optimales (Mueller et al., 1989). Le récepteur de costimulation le mieux caractérisé des lymphocytes T naïfs est le CD28 (Greenfield et al., 1998). D'autres molécules exprimées à la surface des lymphocytes T ont aussi des propriétés de costimulation (Watts et DeBenedette 1999). Plusieurs de ces molécules, telles que ICOS, 41BB et OX-40, sont exprimées après activation des lymphocytes T, ce

qui indique que, contrairement au CD28, ces récepteurs interviennent plus tard au cours de la réponse immune plutôt que lors de l'initiation de l'activation des lymphocytes T naïfs.

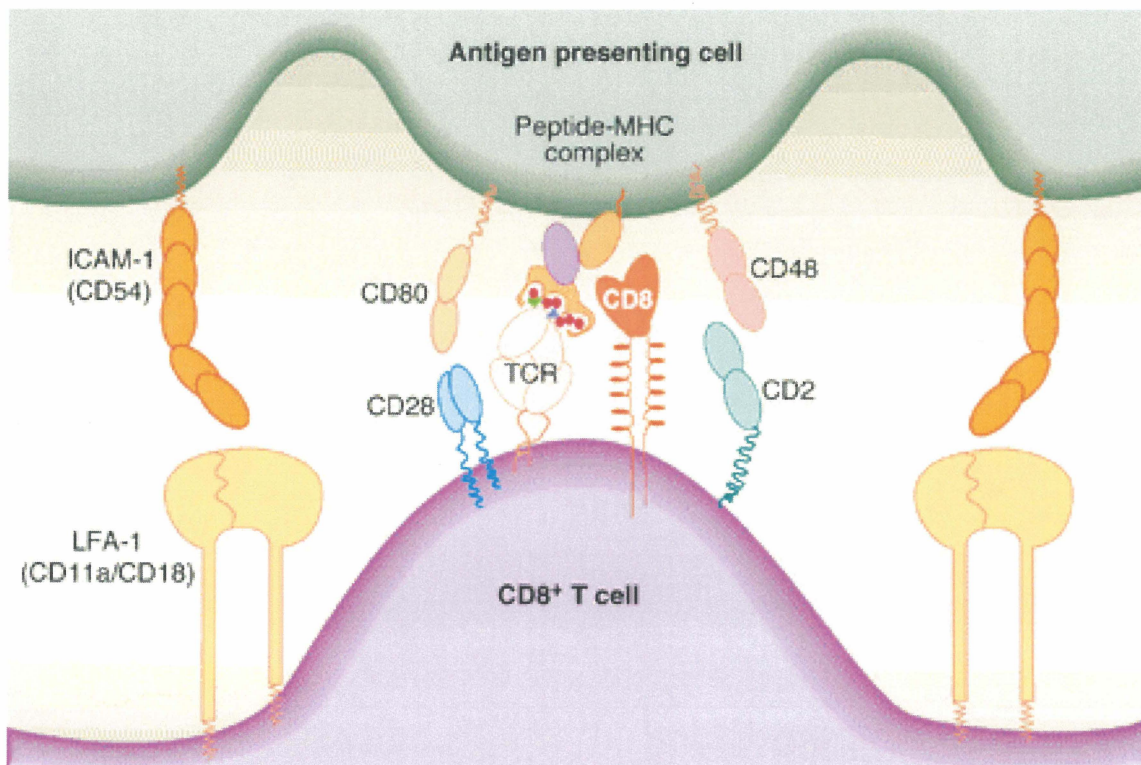


Figure 1 : Différentes molécules impliquées dans la formation de la synapse immune (Malissen 1999).

1.2 Le système B7/CD28/CTLA-4

Le récepteur de costimulation CD28 possède deux ligands, B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86), qui sont exprimés de façon prépondérante mais non exclusive à la surface des cellules spécialisées dans la présentation de l'antigène (les cellules dendritiques, les macrophages, les monocytes et les lymphocytes B activés) (Lenschow et al., 1996). Au début des années 1990, une autre molécule appelée antigène 4 associé au lymphocyte T cytotoxique (CTLA-4), a été identifiée à la surface des lymphocytes T activés (Balzano et al., 1992). Cette molécule présente 31% d'homologie avec le CD28, et tout comme le CD28, elle possède comme ligand les molécules B7.1 et B7.2 (Lenschow et al., 1996). Comme nous l'exposerons dans les sections suivantes, les molécules B7.1, B7.2, CD28 et CTLA-4 forment un système de récepteurs/ligands qui est impliqué dans la régulation de l'activation des lymphocytes T.

1.2.1 CD28

La molécule CD28 est exprimée de façon constitutive sur 95% des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs et sur 50 % des T $CD8^+$ naïfs chez l'humain (June et al., 1994), mais chez la souris, presque 100% des lymphocytes T possèdent le récepteur CD28 (Gross et al., 1990). Ce récepteur transmet un signal positif d'activation des lymphocytes T seulement lorsque ce dernier reçoit un signal via son TCR. Cependant quelques études ont rapporté que le CD28 pourrait transmettre des signaux intracellulaires en absence de stimulation via le TCR (Seifken et al., 1998). Les signaux intracellulaires transmis par le CD28

conduisent à plusieurs altérations physiologiques dans les lymphocytes T : ils préviennent l'anergie, par l'augmentation de l'expression de molécules anti-apoptotiques comme Bcl-XL (Boise et al., 1995), ils augmentent l'expression d'interleukine 2 (IL-2), par leurs effets sur la transcription du gène de IL-2 et la stabilisation de son acide ribonucléique messenger (ARNm), même chose pour l'IL-2R, le CD40L, certaines cytokines (IFN γ , GM-CSF, et TNF α) ainsi que plusieurs protéines du cycle cellulaire (Thompson et al., 1989; Gimmi et al., 1991; Fraser et Weiss 1992). Donc les signaux transmis par le CD28 sont nécessaires pour maintenir en vie et promouvoir la prolifération et la différenciation des lymphocytes T dont le TCR a reconnu un peptide antigénique. L'importance du CD28 dans l'initiation de l'activation des lymphocytes T a également été démontrée *in vivo*. Par exemple, on a montré dans plusieurs systèmes expérimentaux que si on empêche l'interaction du CD28 avec ses ligands, on peut inhiber la réponse humorale, prolonger la survie des greffes et supprimer le développement de plusieurs maladies autoimmunes (Lenschow et al., 1996). De plus, les souris qui ont une délétion du gène codant pour le CD28 ne peuvent pas développer une réponse immunitaire adaptative efficace contre les antigènes protéiques, et certains virus. Une des raisons est la diminution de la survie des lymphocytes T, impliquant une perte d'efficacité dans la génération d'une réponse mémoire (Dahl et al., 2000). De plus, on note l'absence de centres germinatifs au niveau de la rate, ce qui suggère une déficience dans l'interaction entre les lymphocytes T et les lymphocytes B (Samson 2000).

1.2.2 CTLA-4

Contrairement au CD28, le CTLA-4 est un régulateur négatif de l'activation des lymphocytes T (Waterhouse et al., 1996). Il n'est pas exprimé de façon constitutive chez les lymphocytes T naïfs, mais son expression est induite chez les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺, 24 à 48 heures suivant l'activation (Freeman et al., 1992). Il a été démontré chez les lymphocytes T activés, que le CTLA-4 circulerait de la membrane vers le cytoplasme à l'intérieur de vésicules et que la majorité de ce CTLA-4 se retrouve principalement de façon intracellulaire (Leung et al., 1995). Le CTLA-4 joue également un rôle essentiel dans la régulation de la tolérance face aux molécules du soi. En effet, des souris déficientes en CTLA-4 meurent 2 à 3 semaines suivant la naissance suite à des maladies autoimmunes comme une myocardite, une pancréatite et la destruction de plusieurs organes (Tivol et al., 1995; Waterhouse et al., 1995). Une des caractéristiques des souris déficientes en CTLA-4, est la grande lymphoprolifération des lymphocytes T CD4⁺ et des lymphocytes T CD8⁺ accompagnée par un débalancement dans le ratio lymphocytes T CD4⁺/T CD8⁺, le ratio passant 2 :1, 3 :1 à 6 :1 allant même jusqu'à 20 :1 (Chambers et al., 1997). Ceci suggère un effet différentiel de la signalisation via le CTLA-4 chez les lymphocytes T CD4⁺ *versus* les lymphocytes T CD8⁺. Le CTLA-4 serait très important dans la régulation négative de la réponse primaire et secondaire des lymphocytes T CD4⁺ (Chambers et al., 1999) tandis que, son implication dans la régulation négative des lymphocytes T CD8⁺ serait seulement lors d'une deuxième rencontre avec l'antigène (Chambers et al., 1998).

1.2.3 Les molécules de la famille B7

B7.1 et B7.2 sont les deux membres de cette famille ayant été décrits comme liant les molécules CD28 et CTLA-4. Ils ont 25% d'homologie entre eux et font partie de la superfamille des immunoglobulines (Freeman et al., 1993). Leur affinité pour la molécule CTLA-4 étant d'au moins 20 fois supérieure à celle pour le CD28 (Linsley et al., 1991). B7.1 et B7.2 sont exprimés sur les CPA mais à des niveaux différents suivant l'activation ou non de ces cellules. Chez la plupart des CPA non-activées, on ne retrouve pas d'expression de la molécule B7.1 mais on retrouve une faible expression constitutive de la molécule B7.2 (Harris et Ronchese 1999). De plus, la cinétique d'expression des molécules B7.1 et B7.2 est très différente. En général, la molécule B7.2 apparaît beaucoup plus rapidement et à des niveaux beaucoup plus élevés que la molécule B7.1. L'expression de la molécule B7.2 sur les lymphocytes B est maximale entre 18 et 24 heures suivant l'activation, tandis que pour la molécule B7.1, on doit attendre de 48 à 72 heures pour une expression maximale (Hathcock et al., 1994). L'expression des molécules B7.1 et B7.2 ne se limite pas aux CPA. On retrouve de faibles quantités de B7.2 exprimés de façon constitutive à la surface de lymphocytes T naïfs chez la souris. L'expression de B7.2 augmente suivant l'activation des cellules T (Greenfield et al., 1997). Pour ce qui est de B7.1 on le retrouve à la surface des lymphocytes T seulement après activation (Azuma et al., 1993). Plusieurs hypothèses tant qu'au rôle des molécules de la famille B7 ont été suggérées. Une de ces hypothèse est que les lymphocytes T auraient également un rôle de CPA, ce qui expliquerait la présence de molécules de costimulation à leur surface cellulaire (Prabhu Das et al., 1995; Hakamada-Taguchi et al.,

1998; Schweitzer et Sharpe 1999). D'autres auteurs suggèrent que la présence de B7.2 sur les lymphocytes T aurait plutôt un effet inhibiteur de l'activation en liant préférentiellement la molécule CTLA-4 (Greenfield et al., 1997; Höllsberg et al., 1997). Finalement, une étude plus récente a démontré que l'acquisition de la molécule B7.1 par les lymphocytes T rend ces derniers capables d'agir comme CPA, tandis que l'acquisition de la même molécule par les lymphocytes T mémoires conduit à l'apoptose lorsqu'il y a augmentation du signal 1 suite à la liaison du TCR. La molécule B7.1 chez les lymphocytes T pourrait donc jouer un rôle immunostimulateur ou immunorégulateur dépendant de la maturité de la population des lymphocytes T qui l'exprime (Sabzevari et al., 2001). Une autre différence marquée entre B7.1 et B7.2 est au niveau de la queue cytoplasmique. B7.1 possède une très petite queue cytoplasmique tandis que B7.2 possède une queue beaucoup plus longue. La partie intracellulaire du B7.2 contient trois sites potentiels de phosphorylation (Freeman et al., 1993). Jusqu'à présent il y a peu d'études sur la signalisation potentielle des molécules B7.1 et B7.2, mais deux études semblent démontrer que la liaison de B7.2 sur les lymphocytes B n'est pas un événement sans conséquences. Il semble en effet que, suite à la liaison du récepteur des cellules B (BCR) et de B7.2, il y aurait une augmentation de la sécrétion de IgG1 ainsi que de IgE (Kasprowicz et al., 2000). De même, la signalisation via IL-4 et IL-13 chez les lymphocytes B additionnée à la liaison du CD40, CD21 et du B7.2 induiraient l'augmentation d'expression des immunoglobuline IgE et IgG4 (Jeannin et al., 1997). Il est maintenant établi que B7.1 et B7.2 interagissent avec le CD28 et le CTLA-4. Par contre, il n'est pas encore clair comment ces liaisons influencent le devenir des lymphocytes T en périphérie suite à la liaison de leurs TCR. Mais les études effectuées

avec des souris déficientes au niveau de B7.1 et/ou B7.2, nous indiquent que B7.2 serait le ligand majeur pour le CD28 dans l'initiation de la réponse des lymphocytes T (Harris et Ronchese 1999).

1.3 La tolérance des lymphocytes T

La tolérance se définit comme un état de non réponse du système immunitaire face aux antigènes du soi. C'est une caractéristique essentielle du système immunitaire. Lorsqu'il y a perte des mécanismes de tolérance, les cellules immunitaires peuvent s'attaquer à nos propres tissus et causer des maladies autoimmunes. Un bon exemple de maladie autoimmune est le diabète insulino-dépendant. Cette maladie auto-immune est caractérisée par la destruction des cellules β productrices d'insuline situées dans les îlots de Langerhans à l'intérieur du pancréas. La destruction des cellules β est liée à l'action cytotoxique des lymphocytes T $CD8^+$ et à la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante d'anticorps (l'ADCC) (Tisch et McDevitt, 1996). Il s'agit donc dans ce cas de la destruction de nos propres cellules causée par une réponse humorale et cellulaire face à des antigènes du soi. Il est alors important de posséder des mécanismes de tolérance fonctionnels pour éviter l'attaque par notre système immunitaire de nos propres cellules. La tolérance agit à deux niveaux: lors du développement des lymphocytes T dans le thymus (tolérance centrale) et, en périphérie, lorsque les lymphocytes T ont atteint le stade mature (tolérance périphérique).

1.3.1 La tolérance centrale

Avant de se retrouver en circulation, les lymphocytes T subissent un processus de maturation dans le thymus. Lors de cette maturation, plus de 98% des thymocytes sont éliminés par apoptose (Von Boehmer, 1992). Cette élimination est nécessaire pour développer un répertoire de lymphocytes T fonctionnels et ne présentant pas d'autoréactivité avec les molécules du soi. Le mécanisme de tolérance au niveau du thymus s'appelle la délétion clonale (Heath et al., 1996). Lors de la sélection positive et négative, seulement les thymocytes ayant un TCR fonctionnel et ne reconnaissant pas avec une trop grande avidité les peptides du soi survivent et atteignent la circulation. Un thymocyte dont le TCR ne reconnaît pas de molécules du CMH présentant des peptides du soi sera éliminé. Il s'agit de la sélection positive. Par contre, un thymocyte dont le TCR reconnaît avec une trop forte avidité le complexe CMH/peptide du soi sera éliminé par apoptose. C'est la sélection négative. L'avidité est la somme de la force de liaison entre le ligand et le récepteur (affinité) et la densité du ligand (Oehen et al., 1996).

1.3.2 La tolérance périphérique

Malgré la délétion clonale, il y a en circulation des lymphocytes T matures qui reconnaissent les molécules du soi (Stockinger, 1999). L'origine de ces lymphocytes peut s'expliquer de plusieurs façons. Premièrement, ce ne sont pas tous les peptides du soi qui sont présentés dans les thymus, et/ou certains peptides du soi sont présentés à de trop faibles niveaux dans le thymus pour induire la tolérance (Ohashi et al., 1991). Une autre

raison pour expliquer la présence d'autoimmunité est la mimicrie moléculaire faite par certains peptides viraux. En effet, certains peptides viraux miment des peptides du soi et induisent l'activation des lymphocytes T face à leurs propres cellules (Karlsen et Dyrberg 1998; Farris et al., 2000). Pour toutes ces raisons, des mécanismes de tolérance périphérique sont indispensables. Un premier mécanisme de tolérance périphérique est l'ignorance immunologique. Ce mécanisme est basé sur le fait que certains lymphocytes T naïfs en circulation reconnaissent les antigènes du soi, mais avec une trop faible avidité. En conséquence, ils ne sont pas normalement activés et ils ignorent les antigènes rencontrés (Stockinger, 1999). Un second mécanisme est l'anergie. Lorsqu'un lymphocyte T naïf rencontre un antigène en périphérie via son TCR en absence de signaux de costimulation, il devient anergique (Mueller et al., 1989 ; LaSalle et Hafler, 1994). Un dernier mécanisme impliquerait la participation de cellules suppressives, dont un type cellulaire a été récemment identifié. Ces cellules suppressives sont les lymphocytes T $CD4^+$ immunorégulateur ayant comme phénotype $CD25^+$. Ces lymphocytes T représentent de 5 à 10% des lymphocytes T $CD4^+$ retrouvés dans les organes lymphoïdes secondaires. Ils auraient comme fonction d'inhiber la production de IL-2 (Thorton et Shevach, 1998), et de diminuer l'expression de molécules de costimulation à la surface des cellules dendritiques (Cederbom et al., 2000). Plusieurs hypothèses non exclusives expliqueraient leurs modes d'action dans la tolérance. En effet, des évidences semblent démontrer que les lymphocytes T immunorégulateurs agiraient par contact cellules/cellules (Takahashi et al., 2000) ou par la sécrétion de cytokines comme IL-4 (Zhai et Kupiec-Weglinski, 1999), IL-10 (Asseman et al., 1999) et TGF β (Powrie et al., 1996). Un exemple concret de l'utilité des lymphocytes T $CD4^+$

CD25⁺ dans le contrôle de l'autoimmunité a été observé entre autre au niveau du diabète autoimmun (Salomon et al., 2000). Malgré l'importance que peuvent avoir les lymphocytes T immunorégulateurs au niveau de l'autoimmunité, leur déplétion peut quand même avoir des effets positifs. C'est effectivement le cas au niveau de la réponse immune anti-tumorale. La déplétion des cellules immunorégulatrices induit une réponse immune suite à la stimulation avec des antigènes de faible avidité comme on retrouve au niveau des cellules tumorales. Ceci permet une réponse immune spécifique aux antigènes tumoraux (Shimizu et al., 1999).

1.4 Les lymphocytes T cytotoxiques

Les lymphocytes T cytotoxiques expriment le co-récepteur CD8. Les lymphocytes T CD8⁺ répondent aux peptides antigéniques présentés dans le contexte d'un CMH de classe I. Ces peptides antigéniques dérivent principalement de pathogènes qui se multiplient à l'intérieur des cellules, comme les virus et certaines bactéries intracellulaires (Watts et Powis, 1999). Récemment, il a été démontré que le CMH I pouvait également présenter des peptides provenant de vésicules d'endocytoses (Kleijmeer et al., 2001; Norbury et al., 2001). Le principal rôle des lymphocytes T CD8⁺ dans la défense immunitaire est l'induction de l'apoptose des cellules infectées. Les fonctions effectrices des cellules T cytotoxiques peuvent être médiées de deux façons : par l'expression de récepteurs de surface et par la sécrétion de médiateurs cytotoxiques (Berke, 1995). Un récepteur connu dans l'induction de l'apoptose par les cellules T CD8⁺ est le Fas ligand (FasL). Le FasL est exprimé à la surface des lymphocytes T CD8⁺ suite

à leur activation; il fait partie de la famille des récepteurs du TNF. La liaison du FasL avec son récepteur, le Fas, induit un signal apoptotique au niveau de la cellule infectée (Nagata et Golstein, 1995). Les lymphocytes T $CD8^+$ activés produisent également des granules contenant des protéines cytotoxiques comme la perforine et les granzymes. Ces granules sont libérées par exocytose dirigée lors de la reconnaissance de l'antigène sur la cellule cible. La perforine agit en se polymérisant au travers de la membrane cytoplasmique et formant ainsi un pore (Browne et al., 1999). Lorsqu'une grande quantité de pores sont formés, la membrane perd son intégrité cytoplasmique et laisse entrer rapidement de l'eau et des sels pouvant provoquer la mort de la cellule. Mais le rôle principal des pores formés par la perforine est de faciliter l'entrée dans la cellule des granzymes. Les granzymes sont un groupe de sérine-protéases capable d'induire l'apoptose chez les cellules cibles (Shi et al., 1992). Finalement, les lymphocytes T cytotoxiques peuvent sécréter des cytokines comme l'IFN- γ et le TNF- α . L'IFN- γ a un effet inhibiteur sur la réplication viral (Farrar et Schreiber, 1993). Il induit une augmentation de l'expression des molécules CMH I, ce qui augmente la chance qu'une cellule infectée soit reconnue et éliminée. Il active les macrophages à la fois comme cellules effectrices et comme CPA. Le TNF- α joue également un rôle dans l'activation des macrophages (Stout, 1993).

1.4.1 Les lymphocytes T $CD8^+$ naïfs, mémoires et effecteurs

Pour débiter cette section il est important de définir l'origine des lymphocytes T cytotoxiques. Lors d'une réponse immune primaire face à un antigène, les cellules T

naïves qui ont un TCR de haute affinité pour l'antigène et qui reçoivent un signal de costimulation se différencient en lymphocytes T CD8⁺ effecteurs. La plupart des cellules effectrices vont mourir par apoptose suite à l'élimination de l'antigène, mais celles qui survivront à cette apoptose vont se différencier en lymphocytes T CD8⁺ mémoires (Opferman et al., 1999). Il existe plusieurs différences entre un lymphocyte T cytotoxique naïf, mémoire et effecteur. Premièrement, les marqueurs de surfaces de ces cellules sont bien différents (**tableau 1**). Deuxièmement, les signaux requis pour la survie des lymphocytes T cytotoxiques aux différents stades ne sont pas identiques. Pour qu'un lymphocyte T CD8⁺ naïf puisse survivre en périphérie, cela nécessite un contact continu entre son TCR et un CMH I présentant un antigène du soi de faible affinité, comme le signal impliqué dans la sélection positive au niveau du thymus (Tanchot et al., 1997). La survie d'un lymphocyte T mémoire ne semble pas nécessiter un signal continu via le TCR (Murali-Krishna et al., 2000), mais pourrait dépendre de cytokines comme IL-15 (Lodoice et al., 1998; Ku et al., 2000). Également, les lymphocytes T mémoires répondent beaucoup plus rapidement à une stimulation antigénique qu'un lymphocyte T naïf. Une raison évoquée serait que les cellules T mémoires demeurent en phase G1 tardive et même une faible population serait en phase S/G2+M du cycle cellulaire (Veiga-Fernandes et al., 2000). Ces cellules expriment de hauts niveaux d'ARNm et sont ainsi capables de répondre beaucoup plus rapidement lors de la rencontre de l'antigène (Veiga-Fernandes et al., 2000). Il semble aussi que les lymphocytes T CD8⁺ naïfs ne possèdent qu'une seule fonction effectrice, tandis que les lymphocytes T mémoires peuvent en posséder plusieurs. Finalement, une grande différence entre les lymphocytes T CD8⁺ naïfs, effecteurs et mémoires est leur localisation. En effet, les lymphocytes T naïfs se

retrouvent très rarement dans les tissus périphériques, leur répartition étant largement limitée aux organes lymphoïdes secondaires. Les lymphocytes T effecteurs et mémoires ont pour leur part la possibilité de migrer au site d'infection et effectuer leurs fonctions cytotoxiques (Austraup et.al., 1997).

Tableau 1. Différents marqueurs de surfaces retrouvés chez les lymphocytes T CD8⁺ au stade naïf, mémoire et effecteur (Dutton et al., 1998).

Marqueur	T CD8 ⁺ Naïfs	T CD8 ⁺ mémoires	T CD8 ⁺ effecteurs
CD44	+/-	++	++
CD45RB	++	+	+
CD62-L	++	+/-	+/-
IL-2R^β	+/-	+	+
IL-2R^α	+/-	+	++
CD69	+/-	+/-	++

+/- : Faible

+ : Modéré

++ : Élevé

(

1.5 Projet de recherche

Afin de mieux comprendre le rôle *in vivo* de la molécule B7.2, des souris exprimant de façon constitutive cette molécule sur les lymphocytes B et T ont été générées grâce à la technique de la transgénèse. Le transgène B7.2 utilisé contient le promoteur d'une molécule du CMH de classe I (H2-Kb) et une séquence « enhancer » de la chaîne lourde μ des immunoglobulines connue pour diriger l'expression de transgènes dans les lymphocytes B et T. Trois lignées transgéniques indépendantes ont été obtenues dans lesquelles B7.2 est exprimée à des niveaux faibles (lignée B7.2low), modérés (lignée B7.2mod) ou modérés à élevés (lignée B7.2hi). Dans ces trois lignées, B7.2 est exprimé de façon similaire à des niveaux élevés sur les lymphocytes T. Ces souris B7.2 transgéniques ont été générées originellement dans le but de vérifier l'hypothèse selon laquelle une expression constitutive élevée du ligand de costimulation B7.2 sur des lymphocytes B serait suffisante pour induire l'activation de lymphocytes T auxiliaires (Th) auto-réactifs et conduire au développement de maladies autoimmunes systémiques. Contrairement à toute attente, ce système transgénique a révélé que l'expression constitutive de B7.2 sur les lymphocytes B qui se développent dans la moelle osseuse conduit à leur élimination. Ce résultat inattendu a été confirmé par un autre groupe de recherche qui a aussi produit des souris transgéniques exprimant B7.2 de façon constitutive sur les lymphocytes B (Van Parijs et al., 1997). Les lymphocytes T sont responsables de l'élimination des lymphocytes B qui se produit dans les souris des lignées transgéniques B7.2mod et B7.2hi et cette élimination requiert l'expression de la molécule CD28 (Fournier et al., 1997). Des observations rapportées dans la littérature

suggèrent que l'interaction entre CD28 et ses ligands pourraient avoir des effets différents sur les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ (Yu et al., 2000). Le but de notre projet de recherche était de déterminer si l'élimination des lymphocytes B dans les souris transgéniques B7.2mod et B7.2hi était due à une interaction avec les lymphocytes T $CD4^+$ et/ou $CD8^+$ et si cette interaction résultait en un effet différentiel sur ces deux types de lymphocytes T. Dans ce but, nous avons généré des souris B7.2 transgéniques qui sont déficientes au niveau de l'expression des molécules du CMH de classe I ou de classe II. Les souris qui ont une délétion dans le gène qui code pour la molécule β -2 microglobuline sont déficientes dans l'expression des molécules du CMH de classe I (Zijlstra et al., 1990). À cause de cette déficience, les lymphocytes $CD8^+$ ne sont pas positivement sélectionnés dans le thymus et très peu de lymphocytes T $CD8^+$ matures sont produits. Dans les souris B7.2 transgéniques qui ont aussi une délétion du gène qui code pour la molécule β -2 microglobuline, nous avons pu étudier l'effet de la molécule B7.2 *in vivo* sur les lymphocytes T $CD4^+$. D'autre part, les souris de H-2b qui ont une délétion dans le gène qui code pour la chaîne β de la molécule du CMH de classe II I-A sont déficientes dans l'expression des molécules du CMH de classe II (Cosgrove et al., 1991; Grusby et al., 1991), puisque dans la souche génétique H-2b l'autre molécule du CMH de classe II, I-E, n'est pas exprimée (Grusby et al., 1991). Dans ces souris mutantes, les lymphocytes $CD4^+$ ne sont pas positivement sélectionnés dans le thymus et très peu de lymphocytes T $CD4^+$ matures sont produits. Donc, les souris B7.2 transgéniques qui ont aussi une délétion du gène qui code pour la chaîne β de la molécule I-A, nous ont permis d'étudier l'effet de la molécule B7.2 *in vivo* sur les lymphocytes T $CD8^+$. L'étude de ces souris démontre que les deux types de lymphocytes T sont capables

d'éliminer les lymphocytes B qui expriment de façon constitutive la molécule B7.2. Par contre, les lymphocytes T $CD4^+$ sont beaucoup plus efficaces que les lymphocytes T $CD8^+$. De plus, notre analyse a permis de révéler un effet différentiel de l'expression de la molécule B7.2 à la surface des lymphocytes T sur l'activation des lymphocytes T $CD8^+$.

2. Matériel et Méthodes

2.1 Génotype des souris B7.2 Tg

L'étape la plus critique dans les expériences qui ont été réalisées est l'identification des souris possédant le transgène B7.2. Pour ce faire, on récolte suite à une coupure sur la queue de la souris environ 5 gouttes de sang qui sont déposées dans un tube de Facs contenant 1 ml d'une solution d'Alsevier (dextrose 114 mM, citrate de sodium dihydrate et NaCl 27 mM) le tout ajusté à pH 6.1. Cette solution empêche la coagulation des globules rouges. On dépose dans le fond du tube de Facs environ 1ml de Ficoll (Pharmacia) à l'aide d'une seringue. On centrifuge le tout à 1600 révolutions par minute (rpm), pendant 20 minutes, à la température de la pièce et on s'assure que le frein n'est pas engagé sur la centrifugeuse. À partir de cette étape on doit garder les échantillons sur la glace. On transfère l'anneau de lymphocytes dans un nouveau tube contenant 3 ml de la solution Facs. La solution de Facs est constituée de : (PBS 1X) tampon phosphate/saline (NaCl 150 mM, NaH_2PO_4 2 mM, Na_2HPO_4 8 mM) et de 2% de sérum bovin. On centrifuge les échantillons 5 minutes, à 1600 rpm et à 4°C. On retire le surnageant par inversion du tube, on ajoute 1 ml de tampon de lyse des globules rouges (90ml de 0.16 M NH_4Cl et 10ml de 0.17 M Tris ajusté à pH 7.2) et on agite le tout au vortex avant de centrifuger de nouveau 5 minutes à 1600 rpm et à 4°C. On élimine de nouveau le surnageant par inversion et on lave les cellules avec de la solution Facs et on centrifuge aux mêmes conditions. On est ensuite prêt à marquer les cellules avec un anticorps anti-B7.2 marqué à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) avant d'aller

acquérir les données au cytomètre de flux et identifier les souris B7.2Tg des souris contrôles (Ctrl).

2.2 Prélèvement et préparation des organes lymphoïdes

Premièrement, on prépare des boîtes de Pétri contenant 5 ml de milieu RPMI 1640 (Gibco BRL) auquel on ajoute au préalable 10 % de sérum de bœuf (Sigma). On sacrifie ensuite les souris et on prélève en premier les ganglions brachiaux, inguinaux et axillaires que l'on groupe dans la même boîte de Pétri. Ensuite on prélève le fémur ainsi que le tibia d'une des pattes de souris que l'on groupe dans une autre boîte de Pétri. On prélève également la rate et le thymus que l'on place dans des boîtes de Pétri séparées. La préparation des ganglions, de la rate et du thymus se fait de façon identique. Il s'agit de dissocier les cellules en les coinçant entre les parties givrées de deux lames de microscope. On rince avec soin les deux lames de microscope avec 3 ml de milieu RPMI 1640 contenant 10% de sérum. On filtre ensuite les cellules sur une membrane de nylon pour éliminer les gros agrégats qui pourrait obstruer la buse du cytomètre de flux. On récupère les cellules dans des tubes de 15 ml, on rince de nouveau la boîte de Pétri avec 5 ml de milieu RPMI + 10% de sérum et on filtre sur membrane de nylon une seconde fois. On centrifuge ensuite les cellules 5 minutes à 1600 rpm et on aspire le milieu. Lorsque nécessaire, on lyse les globules rouges avec 5 ml d'une solution d'ACK (NH_4Cl 0.15 M, KHCO_3 1 mM et $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 0.1 M ajusté à pH 7.2) et on centrifuge 5 minutes à 1600 rpm. Il est à noter que lors de la préparation des cellules de la rate, cette dernière étape est essentielle. Après la centrifugation on aspire et on suspend les cellules dans du milieu

RPMI + 10% de sérum. On centrifuge de nouveau et on répète cette dernière étape une autre fois; si l'on observe encore des débris en suspension dans le milieu, on doit refiltrer sur une membrane de nylon, les cellules. Finalement, on suspend de nouveau les cellules dans 4 ml de milieu pour les ganglions, 5 ml de milieu pour le thymus et 10 ml de milieu pour la rate. Les cellules sont alors prêtes pour être comptées. Toutes les opérations de la préparation des organes lymphoïdes s'effectuent sur glace et les centrifugations se font à 4°C. Maintenant pour ce qui est de la préparation de la moelle osseuse, les premières étapes sont quelque peu différentes. On récupère le fémur et le tibia d'une des pattes de souris en retirant le plus de muscles possible autour de la patte. On coupe ensuite à la hauteur du genou pour séparer le fémur du tibia. À l'aide d'une seringue de 5 ml et d'une aiguille de grosseur 22G, on aspire le milieu de culture de la boîte de Pétri. On introduit l'aiguille à une extrémité du fémur et on pousse le milieu de culture dans l'os pour en éjecter la moelle osseuse. On fait la même opération avec le tibia pour récupérer la moelle. Une fois la moelle osseuse récoltée, on peut jeter les os. On passe ensuite plusieurs fois au travers de la seringue la moelle osseuse pour en séparer complètement les cellules. Suite à ces étapes, on peut continuer les opérations de préparation des cellules des organes lymphoïdes, tel que mentionné auparavant, en s'assurant que la lyse des globules rouges est bel et bien effectuée. Finalement, on suspend la moelle osseuse dans un volume de 5 ml de milieu RPMI + 10% de sérum.

2.3 Comptage des cellules

Une fois les cellules préparées, on les compte avant le marquage avec des anticorps fluorescents. Pour ce faire on dilue les cellules dans du bleu de trypan et on dépose sur un compteur de cellules. On compte le nombre de cellules sur 4 quadrants et on fait la moyenne en excluant les cellules mortes qui prendront une coloration bleue foncée. Le calcul pour connaître le nombre de cellules isolées des organes est le suivant : moyenne des cellules comptées X dilution X 10 000 X le volume où les cellules sont suspendues.

2.4 Marquage des cellules avec anticorps fluorescents.

Premièrement, on distribue les cellules dans des tubes de FACS (1×10^6 cellules par tube) et on lave avec de la solution à FACS. On centrifuge à 1600 rpm pendant 5 minutes à 4°C, on aspire le surnageant et on ajoute 50 µl de 2.4G2. Le 2.4G2 lie les récepteurs de la portion constante de la chaîne lourde des immunoglobulines (Fc) des anticorps et empêche ainsi un marquage non spécifique des cellules. On incube les cellules en présence de 2.4G2 pendant 15 minutes à 4°C, ensuite on ajoute un anticorps primaire biotiné spécifique à un marqueur de surface que l'on veut identifier. Les anticorps biotinés utilisés sont le : CD25, CD44, CD45RB, CD62-L, CD69 et IgM (voir annexe 1). Les anticorps biotinés doivent être combinés à un anticorps secondaire fluorescent pour être détectés. L'anticorps secondaire se liant aux anticorps biotinés est la streptavidine (SA), elle peut être combinée à plusieurs types de molécules fluorescentes

comme la fluorescéine isothiocyanate (FITC), la phyto-érythrine (PE) et le cychrome (Cyc). On incube les cellules en présence d'anticorps biotinés 25 minutes à 4°C, mais cette fois-ci, après l'incubation, on lave avec de la solution de Facs, on centrifuge à 1600 rpm pendant 5 minutes à 4°C et on vide les tubes par inversion et en les épongeant. On ajoute ensuite les anticorps fluorescents et on incube 25 minutes à 4°C dans le noir. Les anticorps fluorescent peuvent se lier à la biotine comme c'est le cas avec la SA ou avec des marqueurs de surface cellulaire. Il est important de ne jamais combiner deux anticorps avec la même fluorescence ou se liant exactement à un même endroit au niveau d'un récepteur de surface. Les anticorps fluorescents utilisés sont : SA, B7.2, B220, CD4, CD8, CD23, IL-2R β , CTLA-4, INF γ et les V β s (voir annexe 1). Une fois l'incubation terminée, on lave les cellules deux fois avec de la solution de Facs et une fois avec du PBS 1X, puis on suspend les cellules dans un volume d'environ 200 μ l avant d'aller acquérir les données au cytomètre de flux. La centrifugation des derniers lavages se fait dans les mêmes conditions que précédemment et les cellules doivent être entreposées dans le noir à 4°C. Il serait trop long dans cette section d'énumérer tout les combinaisons d'anticorps utilisés, pour cette raison, les combinaisons d'anticorps sont tous comprises dans les titres des figures se rapportant à un marquages cellulaires avec des anticorps fluorescents.

2.5 Perfusion des souris

La perfusion des souris est l'une des étapes importantes lors du prélèvement des organes chez les souris B7.2Tg déficientes au niveau du CMH II dans le but de détecter

la présence de lymphocytes T CD8⁺ qui auraient pu infiltrer les organes de ces dernières. La perfusion est essentielle pour éliminer le sang circulant au niveau des organes et ainsi éliminer les lymphocytes T CD8⁺ en circulation qui auraient pour conséquence de produire des faux positifs lors de la détection de l'ARNm du CD8 au niveau des organes. Pour se faire on commence par paralyser la souris en injectant de façon intrapéritonéale 100 µl de Ketalean dilué 1 : 5 dans du PBS 1X. Par la suite on étale la souris sur le dos et on coupe la peau pour dégager la cage thoracique. On coupe les côtes et le diaphragme que l'on relève pour dégager le cœur. On coupe l'oreillette droite et à l'aide d'une seringue contenant 30 ml de PBS 1X on pique dans le ventricule gauche du cœur et on fait passer tranquillement le PBS 1X au travers la circulation sanguine de la souris. Si la perfusion est bien réussie, le foie de la souris devient d'une couleur jaunâtre et tous les autres organes vont également pâlir. Dans le cas où effectivement la perfusion est bien réussie, on peut alors prélever les organes.

2.6 Tri des lymphocytes T CD8⁺ par sélection négative sur colonne magnétique

Avant d'extraire l'ARNm des cellules de la rate pour détecter la présence de molécules cytotoxiques au niveau des lymphocytes T CD8⁺, nous avons purifié les lymphocytes T CD8⁺ de la rate des souris CMH II déficientes B7.2Tg et Ctrl. Pour ce faire, on sacrifie les souris, on récupère les cellules de la rate et on les compte. Il est à noter que le tampon et les cellules doivent rester sur la glace tout au long des manipulations. Premièrement, on lave les cellules avec du tampon PBS 1X, albumine

sérique bovine (BSA) 0.5% (Sigma), on centrifuge 5 minutes à 1600 rpm, on enlève le surnageant et on suspend les cellules dans le tampon PBS 1X, BSA 0,5% pour un volume de 90 μ l par 10^7 cellules totales. À ce volume on ajoute 10 μ l de MACS CD19 Microbeads (Miltenyi Biotech GmbH) par 10^7 cellules totales et on incube 15 minutes à une température qui se situe entre 6° C et 12° C. Après l'incubation on lave les cellules en ajoutant de 10 à 20 fois le volume de PBS 1X, BSA 0.5%, on centrifuge 5 minutes à 1600 rpm et on resuspend les cellules dans 500 μ l de tampon PBS 1x, BSA 0.5% par 10^8 cellules. Pendant le temps d'incubation, on fait le montage suivant (**Figure 2**). On utilise une colonne de type AS pour 3×10^7 cellules positives, une colonne de type BS pour 10^8 cellules positives ou une colonne de type CS pour 2×10^8 cellules positives (Miltenyi Biotech GmbH). On remplit la colonne par le bas à l'aide d'une seringue avant le début du lavage de cette dernière, afin d'éviter la formation de bulles. On lave la colonne avec du PBS 1X, BSA 0.5% pour un volume de 3 à 5 fois le volume de la colonne utilisée. Lorsque la colonne est lavée, on peut ajouter la suspension cellulaire marquée avec des billes magnétiques. On lave ensuite la colonne avec du PBS 1X, BSA 0.5% pour un volume de 3 à 5 fois le volume de la colonne utilisée. Il est important de recueillir la suspension à la sortie de la colonne parce qu'elle contient les cellules d'intérêt.

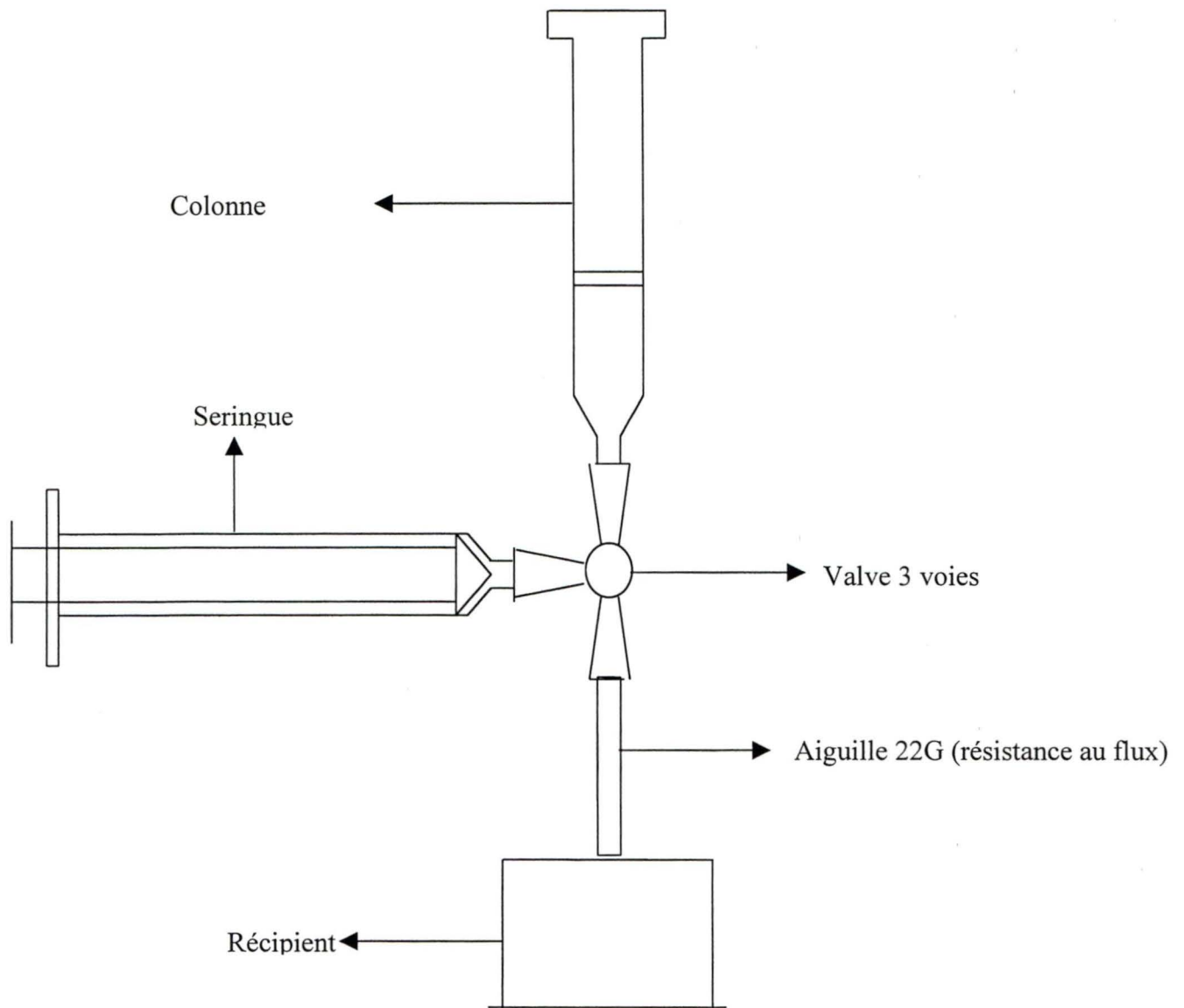


Figure 2. Montage de la colonne magnétique pour déplétion des lymphocytes B chez les souris CMH II^{-/-} de la lignée B7.2mod.

2.7 Extraction de l'ARNm

Pour débiter, il est important de mentionner que tout le processus d'extraction doit se faire dans un environnement exempt de RNase. Pour ce faire, on doit porter des gants tout au long de l'expérimentation, utiliser des instruments, des réactifs et du matériel (embouts de pipettes, tubes eppendorfs) adéquats pour cette fin.

Comme étape préliminaire à l'extraction, on sacrifie les souris et on récupère la rate de celles-ci. On isole les cellules de la rate et on trie ensuite par sélection négative sur colonne magnétique les lymphocytes T CD8⁺, en retirant les cellules exprimant le CD19 comme décrit précédemment. L'extraction débute par l'homogénéisation des cellules. Dans cette étape on suspend les cellules pour avoir une concentration de 10 millions de cellules par ml de Trizol (Gibco BRL). La deuxième étape est celle de la séparation de l'ARNm des lymphocytes T CD8⁺. On laisse les cellules reposer à la température de la pièce pour 5 minutes et on ajoute 200 µl de chloroforme (Sigma). On mélange vigoureusement à la main pendant 15 secondes et on laisse reposer 3 minutes à la température de la pièce. On centrifuge ensuite à une vitesse de 12000 X g pendant 15 minutes à 4°C. Suite à la centrifugation on récupère la phase aqueuse (phase du haut); celle-ci devrait représenter environ 500µl. La troisième étape est l'étape de la précipitation de l'ARNm. On ajoute le même volume de 2-propanol que la phase aqueuse recueillie, soit environ 500µl. On agite lentement le tube par inversion une vingtaine de fois et on laisse reposer 10 minutes à la température de la pièce. Ensuite on centrifuge à 12000 X g pendant 10 minutes à 4°C. Après la phase de précipitation de l'ARNm on enchaîne avec le lavage de l'ARNm; pour ce faire on retire doucement le

surageant par inversion en faisant attention de ne pas perdre le culot. On ajoute 1 ml d'éthanol 75% et on agite au vortex. On centrifuge à 7500 X g pendant 5 minutes à 4°C. Finalement, la dernière étape consiste en la dissolution de l'ARNm et l'entreposage. On doit d'abord retirer le surageant encore une fois avec une grande précaution. On fait sécher les eppendorfs à l'envers jusqu'à ce que les culots deviennent transparents. On suspend l'ARNm dans un volume d'eau exempt de RNase de façon à obtenir une concentration d'ARN entre 0,5 et 10 µg/µl. On incube le tout pendant 10 minutes à 55°C et on s'assure que l'ARNm est bien dissous en mélangeant à l'aide d'une pipette. Lorsque l'ARN est bien dissous on peut le congeler à une température de -80°C.

Lors de l'extraction de l'ARNm des organes de souris CMH II déficientes B7.2Tg et Ctrl, l'étape préliminaire et l'étape d'homogénéisation changent quelque peu. Premièrement les souris sont perfusées avec du PBS 1X avant d'être sacrifiées, afin d'éliminer les lymphocytes T CD8⁺ se trouvant dans la circulation sanguine au niveau des organes. Ensuite, on isole les organes, on en coupe des petits morceaux que l'on met dans 1 ml de Trizol. On homogénéise le tout avec des potters préalablement nettoyés à l'eau et au savon et rincés à l'éthanol 70%. Le reste des manipulations se fait exactement comme expliqué plus haut dans la section.

2.8 Quantification de l'ARNm

Avant de passer à l'étape de synthèse de l'acide désoxyribonucléique complémentaire (cDNA), on doit quantifier notre ARNm. Pour ce faire on doit lire la densité optique (D.O) à 260 nm et 280 nm de l'ARNm. Dans ce cas, le blanc utilisé pour

faire le zéro sur le spectrophotomètre est constitué de la même eau utilisée pour diluer l'ARNm. La dilution de l'ARNm se situe autour de 1:70. Ensuite, on fait le ratio D.O 260 nm/ D.O 280 nm; un ratio acceptable se situe entre 1.5 et 2.0. Finalement, le calcul utilisé pour quantifier l'ARNm est le suivant : $\text{D.O 260 nm} \times \text{facteur de dilution} \times 40 = \mu\text{g/ml}$ d'ARNm. Encore une fois il est important que les manipulations de l'ARNm se fassent dans un environnement et avec du matériel exempts d'ARNase.

2.9 Synthèse du cDNA avec de la SuperScript II

Suite à la quantification de l'ARNm, on prélève 5 μg de ARNm auxquels on ajoute 0.5 μl d'oligo(dt) (Pharmacia) 500 $\mu\text{g/ml}$. On complète ensuite avec de l'eau pour obtenir un volume total de 12 μl . On incube le mélange à 70°C pour une période de 10 minutes puis on le met sur la glace. On centrifuge « quick spin » pour amener le tout dans le fond de l'eppendorf, puis on ajoute 4 μl de 5X 1st strand buffer (Pharmacia), 2 μl de DTT 0.1M (Sigma) et 1 μl de dNTP 10mM (Pharmacia). On agite le tout au vortex et on centrifuge de nouveau pour amener le mélange dans le fond de l'eppendorf. On incube à 42°C pendant 2 minutes, on ajoute 1 μl de SuperScript II (Gibco BRL), on mélange et on centrifuge le tout. Ensuite, on incube 50 minutes à 42°C et 15 minutes à 70° C, pour finalement ajouter 80 μl d'eau et ainsi obtenir du cDNA dans un volume de 100 μl . Le cDNA ainsi synthétisé est conservé à -80°C.

2.10 Conditions de PCR

Lorsque nous sommes en possession du cDNA on peut alors débiter la réaction de polymérase en chaîne (PCR). Comme les quantités des différentes solutions à pipetter sont très petites, une bonne façon de procéder et d'effectuer un mélange proportionnelle des différents réactifs selon le nombre de réaction de PCR désiré. Une réaction de PCR devant contenir : 5 µl de cDNA, 32.55 µl d'eau, 1.6 µl d'amorce 5' 25 µM, 1.6 µl amorce 3' 25 µM, 5 µl de tampon 10X pour PCR (Pharmacia), 4 µl de dNTP 2.5mM et 0.25 µl de Taq polymérase (Pharmacia). On mélange le tout, on centrifuge, on ajoute à la surface 50 µl d'huile, et ensuite, on est prêt à effectuer le PCR. Les conditions pour le PCR changent selon la partie du cDNA que l'on veut amplifier. Le GAPDH nous sert de contrôle interne de l'amplification pour fin de comparaison. Les conditions pour l'amplification du GAPDH, de la perforine, du FasL, de l'INF γ et du CD8 sont tous identiques, soient la dissociation des brins d'acide désoxyribonucléique (ADN) à 94°C pendant 30 secondes, l'hybridation des amorces à 57°C pendant 45 secondes et l'élongation des amorces à 72°C pendant 1 minute. Ces trois étapes du cycle sont répétées 30 fois, suivies par la suite d'une période d'élongation supplémentaire à 72°C pendant 10 minutes et finalement le tout est maintenu à une température de 4°C jusqu'à la mise sur gel d'agarose (Sigma). Pour ce qui est de l'amplification de cDNA de granzyme B on utilise les mêmes conditions à l'exception du nombre de cycles qui est réduit à 25 au lieu de 30.

Voici maintenant la composition des amorces utilisées : GAPDH-5' CAC TCA CGG CAA ATT CAA CGG C et GAPDH-3' ATC ACA AAC ATG GGG GCA TCG G, perforine-5' TCA ATA ACG ACT GGC GTG TGG G et perforine-3' GTG GAG CTG

TTA AAG TTG CGG G, FasL-5' CTC TGG TTG GAA TGG GAT TAG G et FasL-3' GGT TTA GGG GCT GGT TGT TGC, INF γ -5' CAT TGA AAG CCT AGA AAG TCT G et INF γ -3' CTC ATG AAT GCA TCC TTT TTC G, CD8-5' GAC GCC GAA CTT GGT CAG AAG et CD8-3' GTC TCT GGG GCT GAG ATG TC, Granzyme B-5' GCC CAC AAC ATC AAA GAA CAG G et GranzymeB-3' GAG AAC ACA TCA GCA ACT TGG.

2.11 Électrophorèse sur gel d'agarose

Pour la migration de l'ADN amplifiée suite au PCR, on utilise un gel d'agarose de 2% et si l'on veut vérifier l'intégrité de l'ARN isolé on utilise un gel d'agarose de 1%. Premièrement, on dissout la quantité d'agarose requise dans du tampon TAE 1X (1L de solution stock TAE 50X : 242g Tris, 57.1ml acide acétique et 100 ml 0.5M EDTA) en le chauffant dans un erlenmeyer au four à micro-onde jusqu'à ce que la solution soit transparente. On laisse refroidir l'agarose dissoute jusqu'à ce qu'on soit capable de la tenir dans nos mains. On ajoute du bromure d'éthidium (Sigma) pour une concentration de 0.5 μ g/ml. On peut ensuite couler le gel d'agarose et attendre qu'il polymérise. Pendant le temps de la polymérisation on peut préparer les divers échantillons d'ARN ou d'ADN à faire migrer. Si l'on veut faire migrer de l'ARN, on utilise 5 μ l d'ARN que l'on mélange avec 2 μ l de tampon de chargement et 3 μ l d'eau. Pour la migration des diverses fractions d'ADN amplifiées par PCR, on utilise 17 μ l de fraction d'ADN avec 3 μ l de tampon de chargement, on agite le tout au vortex et on centrifuge pour récupérer tout le mélange dans le fond de l'éppendorf. Finalement, on s'assure que les cuves de l'appareil

à électrophorèse sont bien remplies et que le tampon TAE 1X couvre le gel d'agarose, puis on dépose sur le gel les divers mélanges. On applique ensuite un courant constant de 100 à 150 volts, dépendant de la grosseur du gel, de façon à ce que les échantillons migrent du pôle négatif vers le pôle positif.

2.12 Marquage du CTLA-4 intracellulaire

Les organes lymphoïdes sont prélevés et préparés comme mentionné précédemment. On isole les cellules de la rate et on les marque à l'aide d'anticorps monoclonaux fluorescents environ 2×10^6 cellules. Il s'agit d'un marquage triple ou 3 différents marqueurs fluorescents ont été utilisés. Le premier anticorps utilisé est un anticorps biotiné spécifique au CD44 et lié au fluorescent SA Cyc et le second anticorps est le CD8 Fitc (voir annexe 1). Une fois les cellules marquées à leur surface, on les fixe en les incubant pendant 10 minutes à la température de la pièce, avec de la paraformaldéhyde 1% (PFA 1%) (Sigma). Ensuite, on perméabilise les cellules en les lavant une fois dans du PBS 1X contenant 2% de sérum et 0.3% de saponine (Sigma), et une seconde fois dans du PBS 1X contenant 2% de sérum et 0.03% de saponine. Les cellules sont lavées et suspendues dans une solution PBS 1X contenant 2% sérum et 0.03% de saponine pour un volume final de 100µl. À ce volume on ajoute 2 µl de l'anticorps fluorescent anti-CTLA-4 PE (voir annexe 1) et on agite le tout au vortex. L'anticorps peut donc se lier au CTLA-4 intracellulaire. On incube les lymphocytes pendant 45 minutes sur la glace. Finalement on lave les cellules 2 fois dans du PBS 1X contenant 2% sérum et 0.03% de saponine, puis 2 fois dans la solution de Facs et

finalement 2 fois dans du PBS 1X avant d'acquérir les données au cytomètre de flux. Il est important que toutes les périodes d'incubation soit effectuées à l'abris de la lumière.

2.13 Détection d'IFN γ intracellulaire

Premièrement on isole les lymphocytes de la rate selon la méthode mentionnée précédemment. On suspend les cellules 1×10^6 par ml de milieu RPMI + 10 % de sérum et on ajoute de la brefeldine (Sigma) pour une concentration $20 \mu\text{g/ml}$. On distribue dans une plaque à culture cellulaire de 24 puits à fond plat à raison de 1 ml de la suspension cellulaire par puits. Ensuite on stimule les cellules en ajoutant, soit un anticorps anti-CD3 (2C11) pour une concentration de $1 \mu\text{g/ml}$ par puits ou bien l'équivalent de PBS 1X comme contrôle négatif. On incube la plaque à 37°C pendant 3 heures et on récupère les cellules. On compte alors les cellules et on les distribue à raison de 2×10^6 cellules par tube de Facs. On marque les cellules à l'aide de CD8 PE (voir annexe 1) tel que mentionné dans la section 2.4. Lorsque le marquage est terminé on ajoute $100 \mu\text{l}$ du tampon Cytofix/Cytoperm (Pharmigen) tout en agitant au vortex pour fixer les cellules. On incube 20 minutes sur la glace dans le noir. On lave deux fois avec 1 ml de la solution Perm/Wash 1X (Pharmigen) pour perméabiliser la membrane des cellules; les centrifugations s'effectuent toutes à 4°C et 2000rpm. Suite au dernier lavage on ajoute $0.5 \mu\text{l}$ d'anticorps IFN γ couplé au FITC (voir annexe 1) et on incube 30 minutes sur la glace dans le noir. On lave deux fois avec 1 ml de la solution Perm/Wash 1X; les centrifugations s'effectuent aux mêmes conditions que précédemment. Finalement, on suspend les cellules dans du PBS 1X avant de prendre les lectures en cytométrie de flux.

2.14 Déplétion *in vivo* des lymphocytes T CD4⁺.

Pour dépléter *in vivo* les lymphocytes T CD4⁺, il s'agit d'injecter les souris de façon intrapéritonéal trois jours consécutifs avec 0,5mg d'un anticorps anti-CD4 (GK1.5), dans un volume de PBS 1X n'excédant pas 500µl. Ensuite, on injecte les souris à tous les trois jours avec la même quantité d'anticorps pour une période de 27 jours. Comme contrôle négatif, on se sert de souris chez lesquelles on ne déplete pas les lymphocytes T CD4⁺. À la fin des 27 jours, on sacrifie les souris, on récupère la rate et on isole les lymphocytes pour un marquage des cellules à l'aide d'anticorps fluorescents, dans le but d'acquérir des données par cytométrie de flux. Les anticorps utilisés sont le CD25, CD62-L, CD44 biotinés lié au SA Cyc et le CD4, CD8 PE (voir annexe 1) Pour ne pas sous-estimer les lymphocytes T CD4⁺ lors du marquage, il est important d'utiliser un anticorps reconnaissant un épitope différent que l'anti-CD4 (GK1.5), utilisé pour la déplétion de ces cellules. Pour cette raison nous avons utilisé le CD4 PE de Pharmingen le clone RM4-4.

3. Résultats

3.1 Élimination des lymphocytes B par les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ dans les souris B7.2 transgéniques

Pour déterminer si l'élimination des lymphocytes B dans les souris B7.2mod et B7.2hi était due à leur interaction avec les lymphocytes T CD4⁺ et/ou les lymphocytes T CD8⁺, nous avons généré des souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH de classe I ou CMH de classe II. La présence de lymphocytes B dans la moelle osseuse, la rate et les ganglions périphériques dans ces souris a été déterminée par cytométrie de flux en examinant les cellules qui expriment l'antigène B220, un marqueur de surface exprimé par les lymphocytes B à tous les stades de leur différenciation.

Dans les souris B7.2 Tg déficientes en CMH de classe I, il y a une diminution importante de la fréquence et du nombre absolu de lymphocytes B (cellules B220) dans la moelle osseuse comparativement aux souris Ctrl (**Figure 3 A et B**). Dans les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH de classe II, il y a aussi une diminution de la fréquence et du nombre absolu de lymphocytes B dans la moelle osseuse, mais cette diminution est moins importante que celle observée dans les souris B7.2 Tg déficientes en CMH de classe I (**Figure 3 C et D**). Très peu de lymphocytes B sont détectés dans les organes lymphoïdes périphériques des souris B7.2 Tg, déficientes en CMH de classe I (**Figure 4 A et B; Figure 5 A et B**), ce qui est cohérent avec leur élimination presque complète dans la moelle osseuse, l'organe lymphoïde primaire au niveau duquel se produit le développement des cellules B. Dans les souris Tg déficientes au niveau du CMH de

classe II, la diminution des lymphocytes B dans la rate rappelle celle observée dans la moelle osseuse (**Figure 4 C et D**). En effet, comparativement aux souris Ctrl, le nombre absolu de lymphocytes B dans la rate est diminué, mais cette diminution est moins importante que celle observée dans les souris B7.2 Tg déficientes en CMH de classe I. De façon surprenante il n'y a pas de diminution du nombre absolu de lymphocytes B dans les ganglions périphériques des souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH de classe II (**Figure 5 C et D**).

Ces résultats indiquent donc que les deux sous-populations de lymphocytes T sont capables d'éliminer les lymphocytes B qui expriment de façon constitutive le ligand de co-stimulation B7.2, mais que les lymphocytes T CD4⁺ semblent plus efficaces que les lymphocytes T CD8⁺. Il est important de noter que des résultats identiques ont été obtenus avec les deux lignées de souris B7.2 Tg.

Figure 3. Analyse des lymphocytes B et des lymphocytes T au niveau de la moelle osseuse. (A) Sélection sur les lymphocytes; Fréquence des lymphocytes B marqués avec B220 PE et des lymphocytes T CD4⁺ marqués avec CD4 FITC, profil représentatif des souris CMH I-/- lignée B7.2mod Ctrl n=6 et Tg n=8. (B) Nombre absolu des lymphocytes B et des lymphocytes T CD4⁺ chez les souris CMH I-/- lignée B7.2hi et B7.2mod. (C) Sélection sur les lymphocytes; Fréquence des lymphocytes B marqués avec B220 PE et des lymphocytes T CD8⁺ marqués avec CD8 FITC, profil représentatif des souris CMH II-/- lignée B7.2mod Ctrl n=5 et Tg n=8. (D) Nombre absolu des lymphocytes B et des lymphocytes T CD8⁺ chez les souris CMH II-/- lignée B7.2hi et B7.2mod.

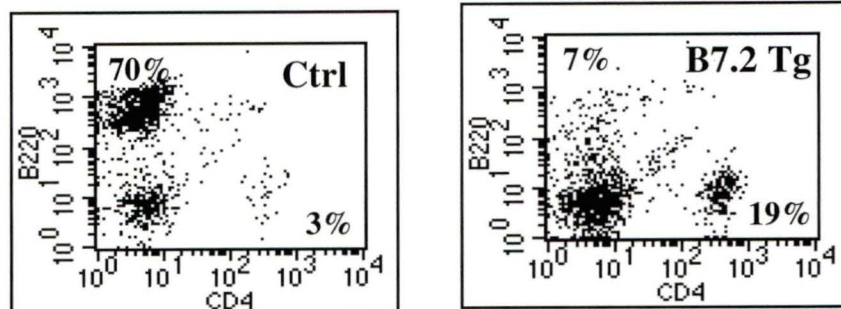
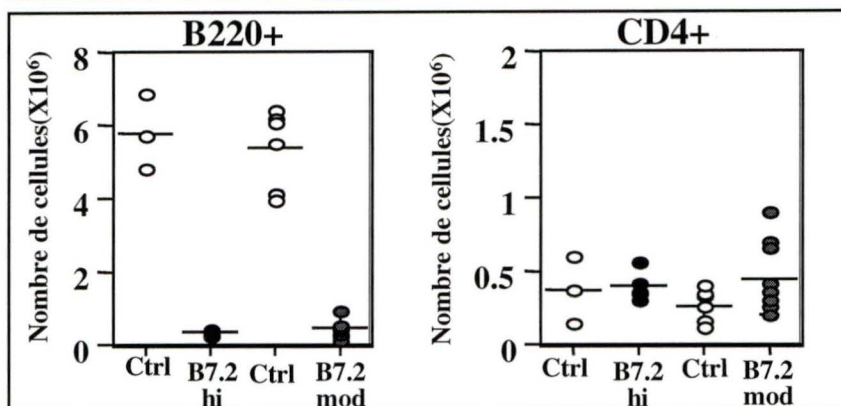
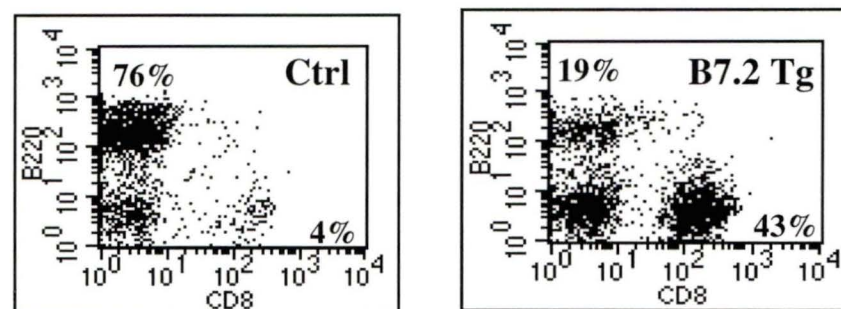
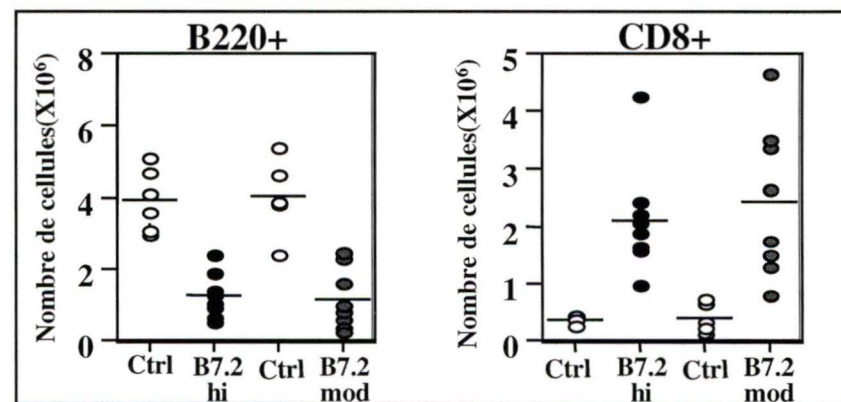
A**CMH I -/-****B****C****CMH II -/-****D**

Figure 4. Analyse des lymphocytes B et des lymphocytes T au niveau de la rate. (A) Sélection sur les lymphocytes; Fréquence des lymphocytes B marqués avec B220 PE et des lymphocytes T CD4⁺ marqués avec CD4 FITC, profil représentatif des souris CMH I-/- lignée B7.2mod Ctrl n=6 et Tg n=8. (B) Nombre absolu des lymphocytes B et des lymphocytes T CD4⁺ chez les souris CMH I-/- lignée B7.2hi et B7.2mod. (C) Sélection sur les lymphocytes; Fréquence des lymphocytes B marqués avec B220 PE et des lymphocytes T CD8⁺ marqués avec CD8 FITC, profil représentatif des souris CMH II-/- lignée B7.2mod Ctrl n=6 et Tg n=10. (D) Nombre absolu des lymphocytes B et des lymphocytes T CD8⁺ chez les souris CMH II-/- lignée B7.2hi et B7.2mod.

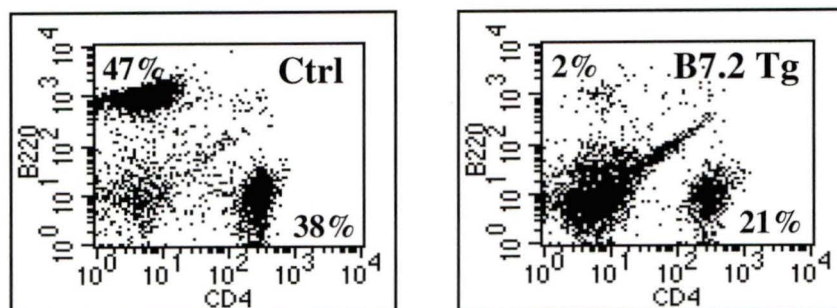
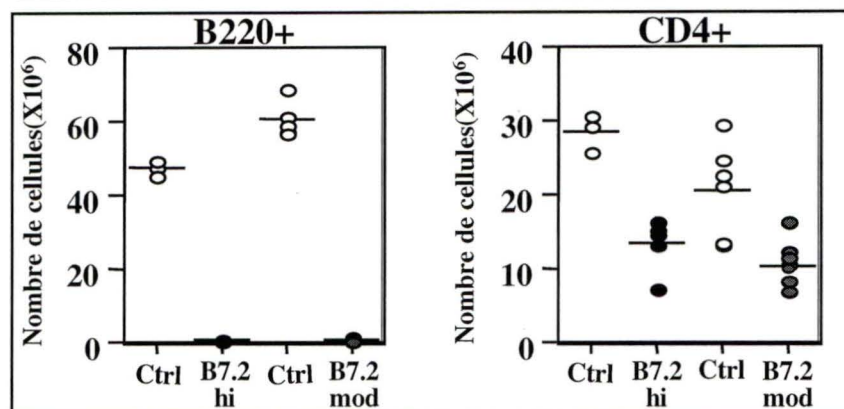
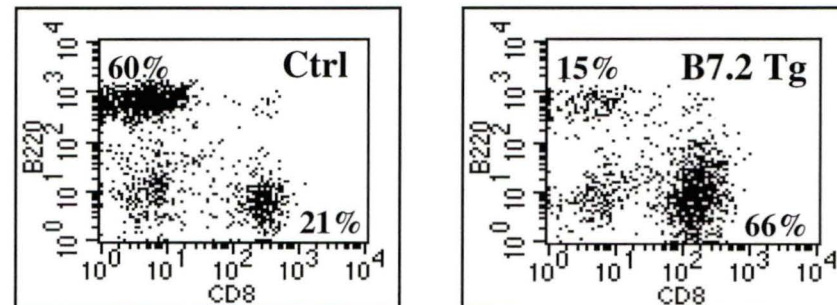
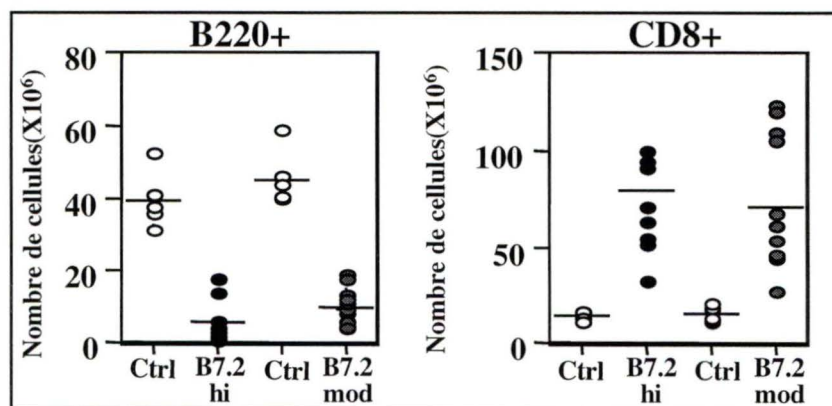
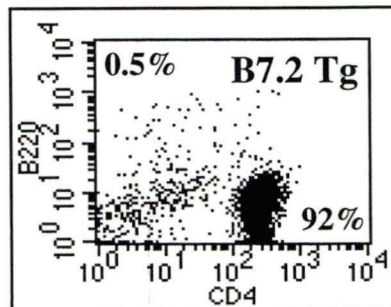
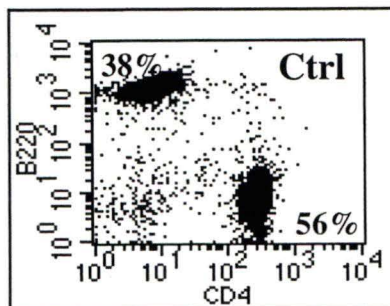
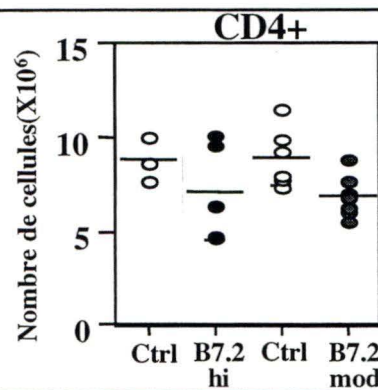
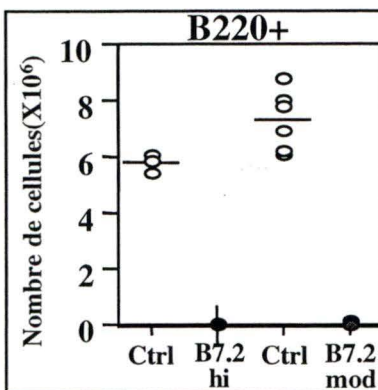
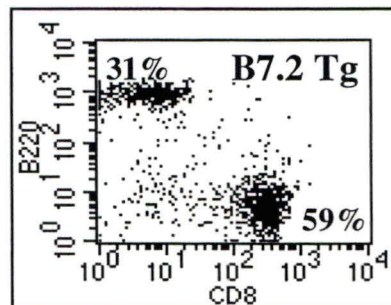
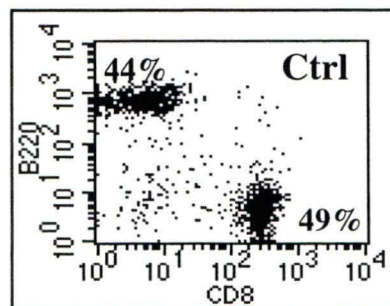
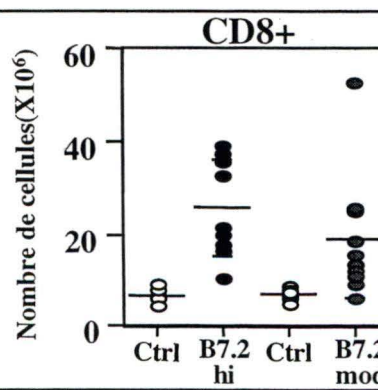
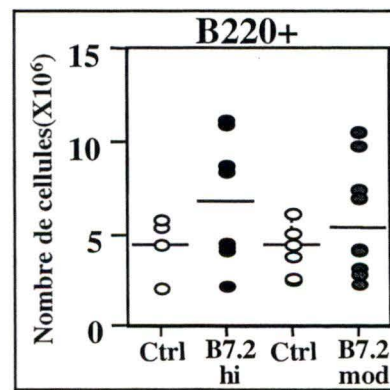
A**CMH I -/-****B****C****CMH II -/-****D**

Figure 5. Analyse des lymphocytes B et des lymphocytes T au niveau des ganglions périphériques. (A) Sélection sur les lymphocytes; Fréquence des lymphocytes B marqués avec B220 PE et des lymphocytes T CD4⁺ marqués avec CD4 FITC, profil représentatif des souris CMH I-/- lignée B7.2mod Ctrl n=6 et Tg n=8. (B) Nombre absolu des lymphocytes B et des lymphocytes T CD4⁺ chez les souris CMH I-/- lignée B7.2hi et B7.2mod. (C) Sélection sur les lymphocytes; Fréquence des lymphocytes B marqués avec B220 PE et des lymphocytes T CD8⁺ marqués avec CD8 FITC, profil représentatif des souris CMH II-/- lignée B7.2mod Ctrl n=6 et Tg n=10. (D) Nombre absolu des lymphocytes B et des lymphocytes T CD8⁺ chez les souris CMH II-/- lignée B7.2hi et B7.2mod.

A**CMH I -/-****B****C****CMH II -/-****D**

3.2 Phénotype des lymphocytes B périphériques des souris B7.2 Tg déficientes en CMH de classe II

Il est étonnant d'observer dans les souris B7.2 Tg déficientes en CMH de classe II une grande diminution du nombre de lymphocytes B au niveau de la moelle osseuse et de la rate, mais non au niveau des ganglions périphériques. Nous avons donc tenté d'identifier la population de lymphocytes B résistante à l'élimination par les lymphocytes T CD8⁺. Dans les souris Ctrl, la majorité des lymphocytes B expriment des niveaux variables d'IgM ainsi que les marqueurs de surface CD23 et CD21. Ce phénotype est caractéristique des lymphocytes B qui ont atteint le stade mature de leur différenciation (Loder et al., 1999). Dans les souris B7.2 Tg, on remarque que bien que les lymphocytes B expriment l'IgM, ces cellules B expriment des niveaux plus faibles de CD23 et de CD21 que ceux exprimés par les lymphocytes B des souris Ctrl (**Figure 6 et 7**). Les lymphocytes B qui sont au stade immature de leur différenciation se caractérisent par une faible expression du CD23 et du CD21. Donc, les lymphocytes B restants dans les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH de classe II possèdent un phénotype caractéristique de cellules B immatures.

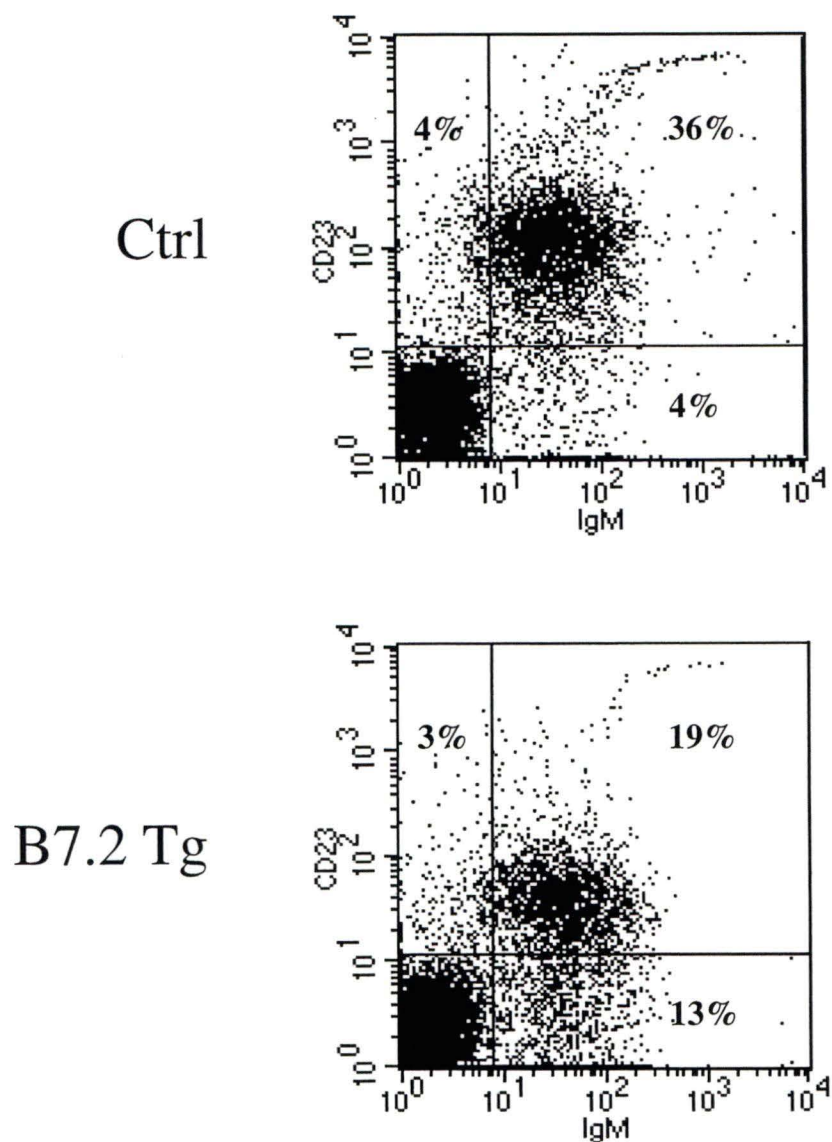


Figure 6. Profil représentatif des lymphocytes B au niveau de la rate chez les souris CMH II -/- lignée B7.2mod Ctrl n=4 et Tg n=7. Sélection sur les lymphocytes; marquages CD23 PE et IgM biot + SA CyC.

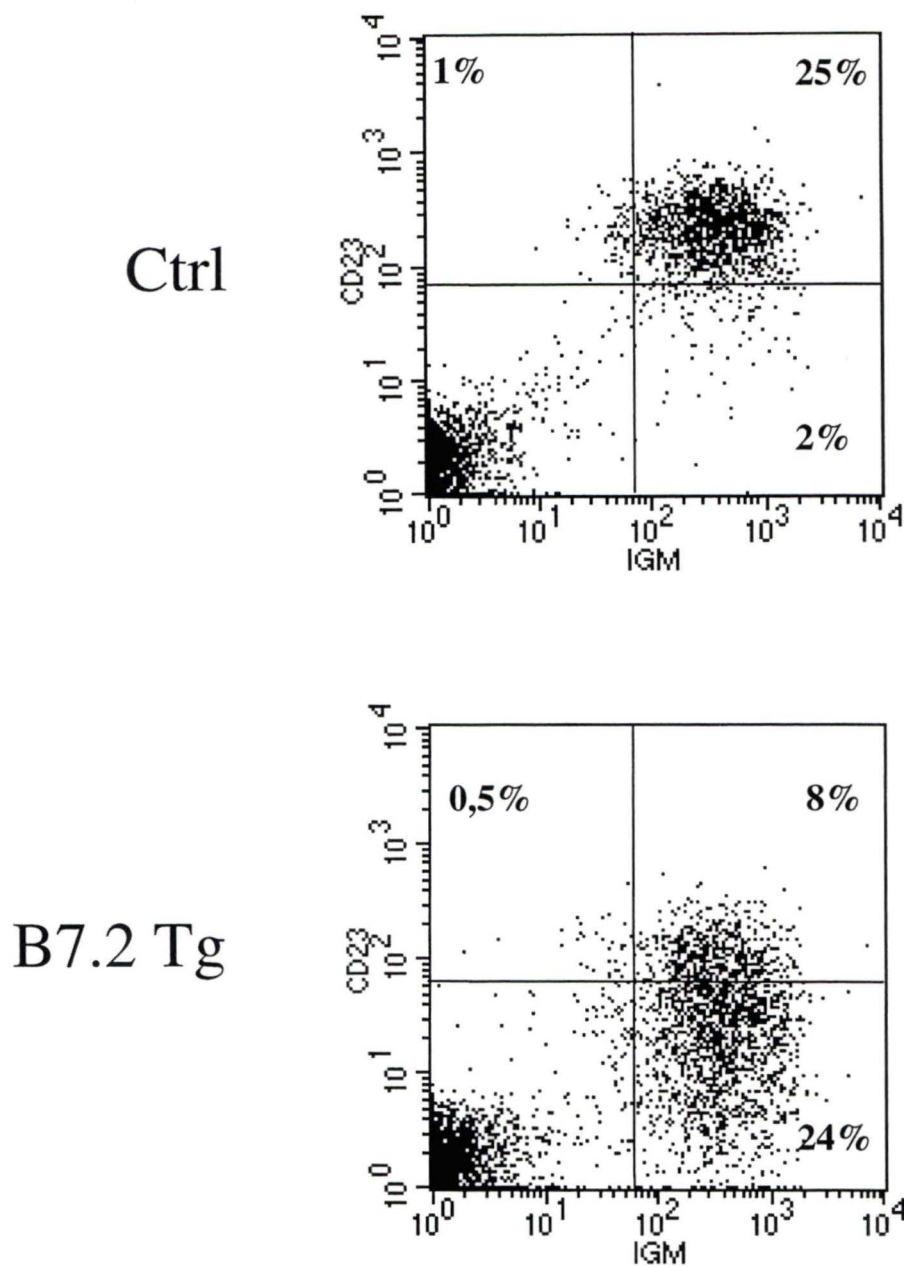


Figure 7. Profil représentatif des lymphocytes B au niveau des ganglions périphériques chez les souris CMH II $-/-$ lignée B7.2mod Ctrl n=4 et Tg n=7. Sélection sur les lymphocytes; marquages CD23 PE et IGM biot + SA CyC.

3.3 Expansion des lymphocytes T CD8⁺ dans les souris B7.2 Tg déficientes en CMH de classe II

Nous avons aussi examiné la présence des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes des souris B7.2mod et B7.2hi déficientes dans les molécules du CMH de classe I ou CMH de classe II afin de déterminer si l'élimination des lymphocytes B par les lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ avait une quelconque conséquence sur ces derniers.

Dans les souris B7.2 Tg déficientes en CMH de classe I, le nombre absolu de lymphocytes T CD4⁺ retrouvés dans la moelle osseuse n'est pas significativement différent à celui des souris Ctrl (**Figure 3 B**). Par contre, une légère diminution du nombre absolu des lymphocytes T CD4⁺ est observée dans la rate et à un moindre degré dans les ganglions lymphatiques (**Figure 4 B et 5 B**). Cette diminution du nombre de lymphocytes T CD4⁺ peut s'expliquer par l'absence presque totale de lymphocytes B dans les organes lymphoïdes de ces souris. En effet, il est bien connu maintenant que les lymphocytes T CD4⁺ naïfs ont besoin de recevoir des signaux via leurs TCR pour survivre en périphérie et ces signaux proviennent de la liaison du TCR avec les molécules du CMH de classe II exprimées par les CPA, dont font partie les lymphocytes B (Ernst et al., 1999). Une diminution du nombre de cellules B pourrait être à l'origine d'une diminution des signaux de survie pour les lymphocytes T CD4⁺.

Contrairement aux lymphocytes T CD4⁺, les lymphocytes T CD8⁺ dans les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH de classe II semblent avoir subi une expansion très importante dans tous les organes lymphoïdes examinés (**Figure 3 D, 4 D et 5 D**). Cette expansion est particulièrement impressionnante au niveau de la rate, ce phénomène

étant confirmé par le fait que la plupart de ces souris présentent une splénomégalie. Encore une fois, l'augmentation du nombre de lymphocytes T CD8⁺ est observée dans les deux lignées de souris Tg.

Ces résultats suggèrent que l'interaction entre la molécule B7.2 et son récepteur CD28 a un effet différentiel sur les lymphocytes T CD4⁺ versus les lymphocytes T CD8⁺.

3.4 Phénotype des lymphocytes T dans les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH de classe I et CMH de classe II.

Suite à l'élimination des lymphocytes B par les lymphocytes T chez les souris Tg déficientes au niveau du CMH de classe I et CMH de classe II, il se peut que les lymphocytes T CD4⁺ et les lymphocytes T CD8⁺ aient subi un certain changement phénotypique. De plus, l'expansion importante des lymphocytes T cytotoxiques pourrait être accompagnée d'un changement dans l'expression de certains marqueurs de surface. Pour ces raisons nous avons caractérisé le phénotype des lymphocytes T CD4⁺ et des lymphocytes T CD8⁺. Premièrement, nous avons regardé le niveau d'expression de certains marqueurs de surface typiques des cellules mémoires : le CD44, CD62-L, CD45RB et IL-2R β . Nous avons aussi examiné la présence de marqueurs d'activation des lymphocytes T : le CD25 et le CD69. Ces marqueurs apparaissent tôt dans l'activation des lymphocytes T et sont dits des marqueurs d'activation précoce. Finalement, nous avons caractérisé les récepteurs directement impliqués dans l'interaction entre les lymphocytes T et les CPA : le TCR avec son co-récepteur (CD4 ou CD8) ainsi que le CD28.

Il n'y a aucune différence significative dans l'expression des marqueurs d'activation ou de mémoire entre les lymphocytes T CD4⁺ isolés des organes lymphoïdes des souris B7.2 Tg et des souris Ctrl (**Figure 8 A et B**). Cependant, les lymphocytes T CD4⁺ isolés des souris B7.2 Tg montrent une grande diminution dans l'expression du récepteur CD28 (**Figure 8 C**). Cette diminution de l'expression du CD28 à la surface cellulaire indique qu'il y a eu interaction *in vivo* entre le CD28 et son ligand B7.2. En effet, on a rapporté une diminution de l'expression du CD28 sur les lymphocytes T incubés *in vitro* avec des cellules CHO transfectées avec l'ADNc codant pour le ligand B7.1 (Linsley et al., 1993).

Dans les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH de classe II, plus de 95% des lymphocytes T CD8⁺ de la rate possèdent un phénotype de cellules mémoires. En effet, la presque totalité de ces lymphocytes T ont comme phénotypes CD44^{élevé}, CD62-L^{faible}, CD45RB^{modéré} et IL2Rβ^{modéré}, ce qui est caractéristique des cellules T mémoires (**Figure 9 A**). Malgré le fait que les lymphocytes T CD8⁺ présentent tous un phénotype mémoire, il n'y a aucun indice démontrant l'activation récente de ces cellules, puisqu'elles n'expriment pas le CD25 et le CD69 (**Figure 9 B**). De plus, on observe une légère diminution dans l'expression de la chaîne β du TCR ainsi que du co-récepteur CD8 (**Figure 9 C**), suggérant qu'il y a eu contact entre le TCR et des complexes peptide du soi/CMH de classe I. En effet, la diminution de l'expression du TCR est un reflet que le lymphocyte T a reçu un stimulus via son récepteur pour l'antigène (Valitutti et al., 1995). De plus, tout comme les lymphocytes T CD4⁺, les lymphocytes T CD8⁺ des souris qui portent le transgène B7.2 montrent une diminution de l'expression du CD28 indiquant qu'il y a eu interaction *in vivo* entre le CD28 et son ligand B7.2. Toutefois cette

diminution est moins importante que celle observée sur les lymphocytes T CD4⁺. Même si on observe une expansion des lymphocytes T CD8⁺ dans les ganglions lymphatiques des souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH de classe II, il semble que le phénotype mémoire soit restreint principalement au niveau des lymphocytes T de la rate. En effet, bien que la fréquence de lymphocytes T CD8⁺ avec un phénotype mémoire soit plus élevée dans les ganglions lymphatiques des souris B7.2 Tg que dans les souris Ctrl (**Figure 10 A**), cette fréquence est moins élevée que dans la rate. De plus, on n'observe pas de diminution de l'expression du TCR et du co-récepteur CD8 sur les lymphocytes T CD8⁺ présents dans les ganglions lymphatiques (**Figure 10 C**). Pour ce qui est de l'expression des marqueurs d'activation précoce, on ne retrouve aucune différence entre la rate et les ganglions périphériques (**Figure 10 B**).

En résumé, malgré le fait qu'il y ait eu interaction *in vivo* entre le ligand B7.2 et le récepteur CD28 exprimé par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, cette interaction se traduit par une altération du phénotype des lymphocytes T CD8⁺ uniquement. Cela constitue une indication supplémentaire que la molécule B7.2 aurait un effet différentiel sur les lymphocytes T CD4⁺ *versus* les lymphocytes T CD8⁺.

Figure 8. Phénotype représentatif des lymphocytes T CD4⁺ de la rate des souris CMH I^{-/-} de la lignée B7.2mod Ctrl n=6 et Tg n=8 (A) Sélection sur les lymphocytes T CD4⁺ marquage (CD44 biot, CD45RB biot et CD62L biot) + SA PE (B) Sélection sur les lymphocytes T CD4⁺ marquage (CD25 biot et CD69 biot) + SA PE. (C) Sélection sur les lymphocytes marquage TCR biot + SA PE, CD4 FITC et anti-CD28 (37N) + goat anti-hamster FITC.

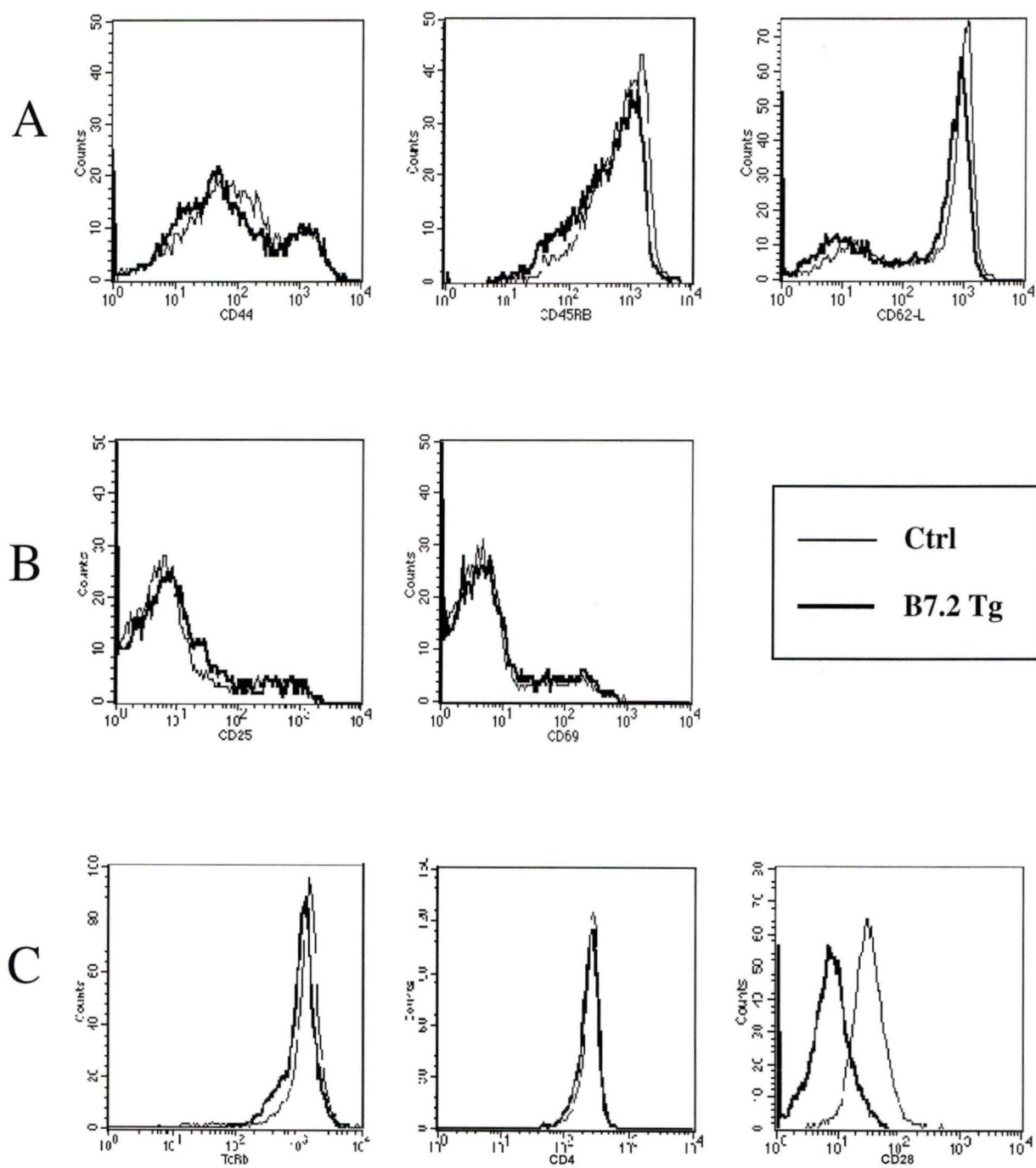


Figure 9. Phénotype représentatif des lymphocytes T CD8⁺ de la rate des souris CMH II^{-/-} de la lignée B7.2mod Ctrl n=6 et Tg n=10 (A) Sélection sur les lymphocytes T CD8⁺ marquage (CD44 biot, CD45RB biot et CD62L biot) + SA FITC et IL-2R β biot + SA CyC (B) Sélection sur les lymphocytes T CD8⁺ marquage (CD25 biot et CD69 biot) + SA FITC. (C) Sélection sur les lymphocytes marquage TCR biot + SA FITC, CD8 PE et anti-CD28 (37N) + goat anti-hamster FITC.

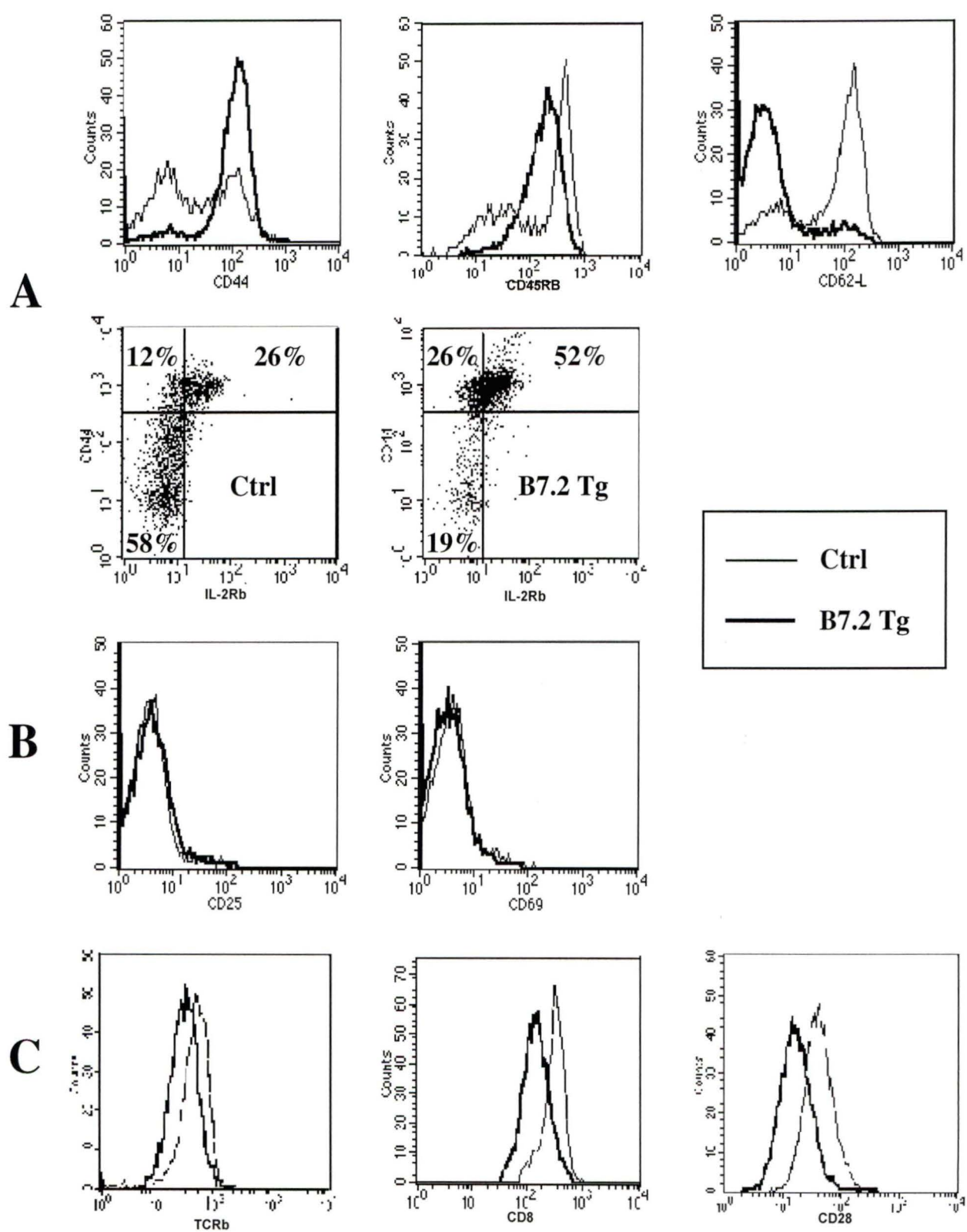
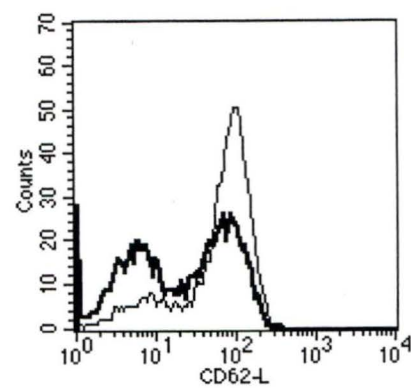
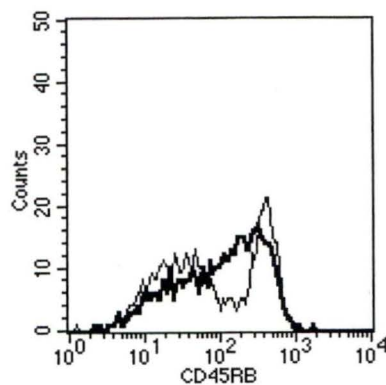
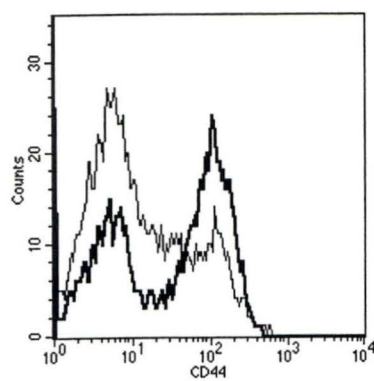
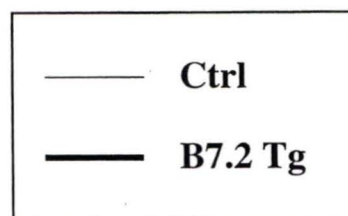
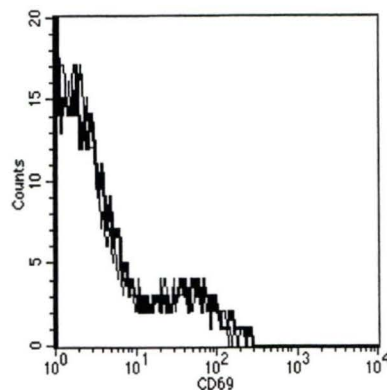
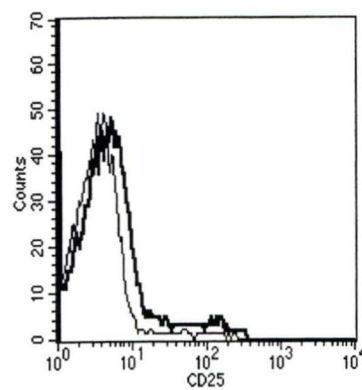


Figure 10. Phénotype représentatif des lymphocytes T CD8⁺ des ganglions périphériques des souris CMH II^{-/-} de la lignée B7.2mod Ctrl n=6 et Tg n=10 (A) Sélection sur les lymphocytes T CD8⁺ marquage (CD44 biot, CD45RB biot et CD62L biot) + SA PE (B) Sélection sur les lymphocytes T CD8⁺ marquage (CD25 biot et CD69 biot) + SA PE. (C) Sélection sur les lymphocytes marquage TCR biot + SA FITC, CD8 PE et anti-CD28 (37N) + goat anti-hamster FITC.

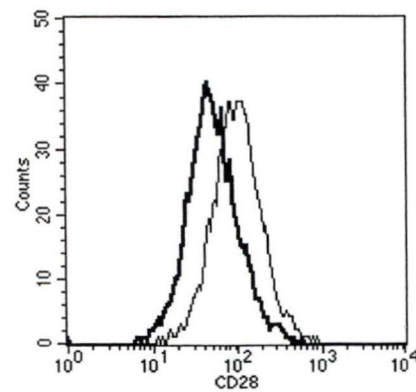
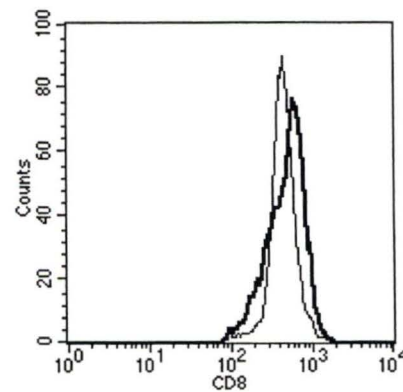
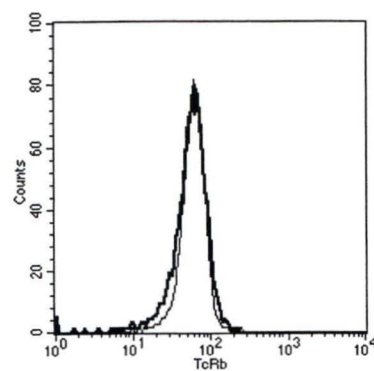
A



B



C



3.5 État fonctionnel des lymphocytes T CD8⁺

Puisque nous sommes en présence d'une expansion phénoménale de lymphocytes T CD8⁺ présentant un phénotype mémoire dans la rate des souris B7.2 Tg CMH de classe II déficientes, nous avons voulu caractériser leur état fonctionnel. Pour ce faire nous avons premièrement déterminé à l'aide de la technique de RT-PCR si ces cellules expriment l'ARNm codant pour des molécules impliquées dans la cytotoxicité des lymphocytes T CD8⁺, telles que perforine, Fas-ligand, granzyme B et INF γ . Comme le montre la **Figure 11**, l'ARNm codant pour ces molécules est difficilement détectable dans les lymphocytes T CD8⁺ qui ont été triés par cytométrie de flux à partir d'une suspension cellulaire de la rate des souris CMH de classe II déficientes Ctrl, et qui sont constitués en grande majorité de lymphocytes T ayant un phénotype naïf. Par contre ces ARNm sont abondants, particulièrement ceux codant pour granzyme B, dans les lymphocytes T CD8⁺ isolés de la rate des souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH de classe II. Nous avons aussi déterminé si les lymphocytes T CD8⁺ isolés des souris B7.2 Tg déficientes en CMH de classe II pouvait produire la cytokine INF γ après une courte stimulation *in vitro*. Comme le montre la **Figure 12**, l'INF γ est détecté uniquement dans les lymphocytes T CD8⁺ isolés des souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH de classe II, lymphocytes qui ont été stimulés *in vitro* pendant 3 heures en présence d'un anticorps anti-CD3 ϵ .

En conclusion, ces résultats indiquent que les lymphocytes T CD8⁺ B7.2 Tg qui ont subi une expansion dans les souris déficientes au niveau du CMH de classe II et qui ont maintenant un phénotype mémoire, ont également un potentiel de cellules effectrices.

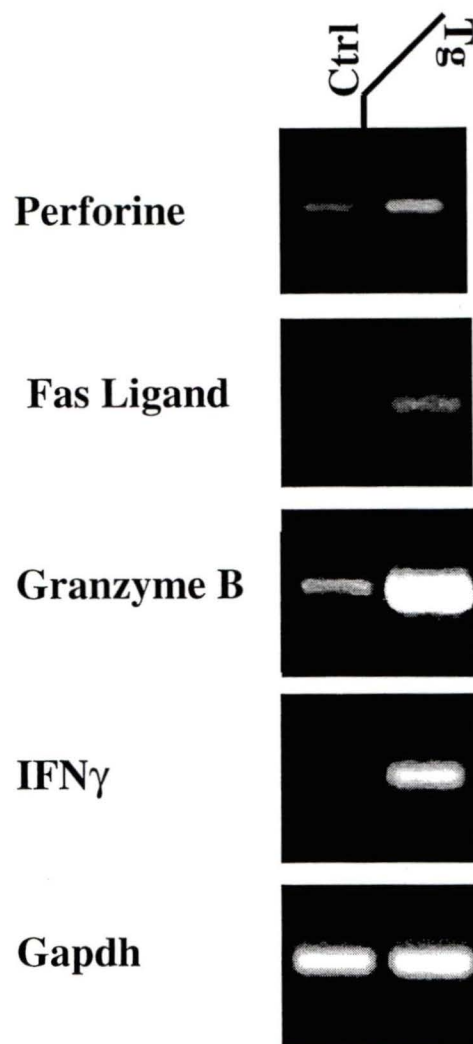


Figure 11. RT-PCR (perforine, FasL, Granzyme B, IL-2, IFN γ et GAPDH) des lymphocytes T CD8⁺ de la rate et des ganglions, de souris CMH II déficientes Ctrl et B7.2mod, trié par sélection négative sur colonne magnétique résultats représentatifs de Ctrl n=4 et Tg n=6. Les amorces utilisées ainsi que les conditions d'extraction de l'ARN et du RT PCR sont décrits à la section 2.10.

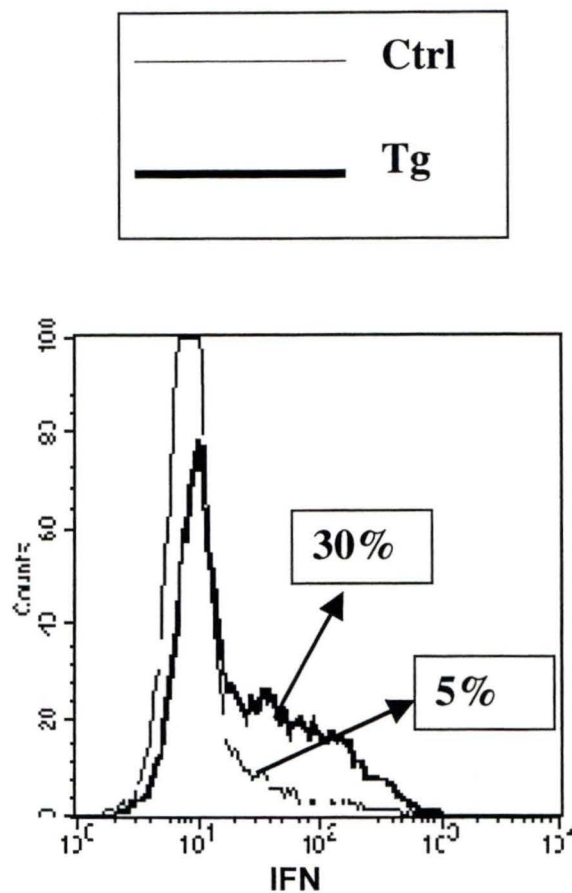


Figure 12. Profil représentatif de la détection d'IFN γ intracellulaires chez les lymphocytes T CD8 $^{+}$ de la rate des souris CMH II $^{-/-}$ lignée B7.2mod Ctrl n=3 et Tg n=5 après stimulation avec 5 μ g/ml anti-CD3 soluble pendant 3 heures en présence de brefeldine 20 μ g/ml. Sélection sur les lymphocytes T CD8 $^{+}$ marquages IFN γ FITC.

3.6 Infiltration des lymphocytes T CD8⁺ B7.2 Tg, au niveau des organes

Nous avons remarqué, que les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH de classe II, avaient une durée de vie plus courte. L'expansion, le phénotype mémoire et le potentiel cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ pourraient jouer un rôle important dans la diminution de la longévité des souris B7.2 Tg. En effet, il est connu que les cellules mémoires ont une meilleure capacité de migrer hors des organes lymphoïdes que les cellules naïves (Westermann et Pabst, 1996). Un nombre augmenté de lymphocytes T CD8⁺ possédant un caractère effecteur et ayant la possibilité de circuler plus librement dans le corps des souris pourrait donc être à l'origine de la diminution de la qualité de vie des souris. Pour vérifier si les lymphocytes T CD8⁺ Tg se localisent effectivement dans divers organes des souris, nous avons prélevé les organes des souris suite à la perfusion de ces dernières. La perfusion est nécessaire pour éliminer les lymphocytes T CD8⁺ circulant dans les vaisseaux sanguins au niveau des organes. Ensuite, pour détecter la présence de lymphocytes T CD8⁺, nous avons utilisé la technique de RT-PCR avec des amorces spécifiques pour la chaîne α de la molécule CD8. Les résultats obtenus sont concluants; on détecte la présence de l'ARNm codant pour la chaîne α de la molécule CD8 dans certains organes et spécialement au niveau de la moelle osseuse et du cerveau (Figure 13).

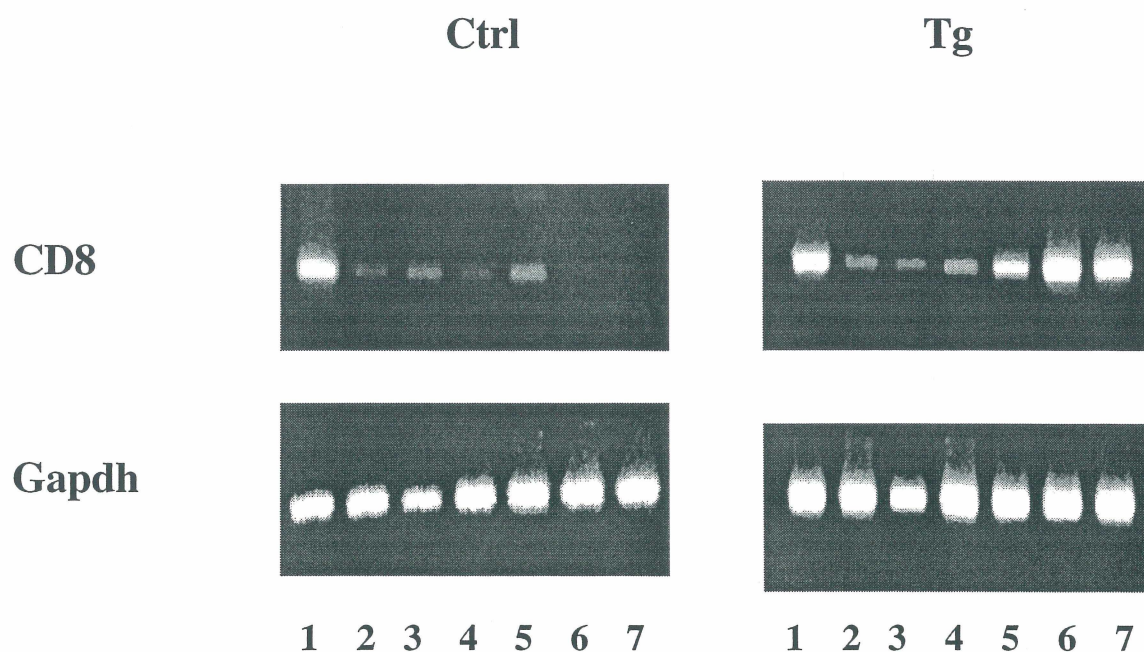


Figure 13. Détection de CD8 par RT PCR sur différentes organes de souris CMH II^{-/-} de la lignée B7.2mod suite à la perfusion des souris (1. Ganglions périphériques 2. Foie 3. Intestin 4. Coeur 5. Rein 6. Cerveau 7. Moelle épinière) résultats représentatif de Ctrl n=3 et Tg n=3. Les amorces utilisées ainsi que les conditions d'extraction de l'ARN et du RT PCR sont décrits à la section 2.10.

3.7 Expansion polyclonale des lymphocytes T CD8⁺

Nous avons également déterminé si l'expansion des lymphocytes T CD8⁺ est polyclonale (plusieurs clones), oligoclonale (quelques clones) ou bien monoclonale (un seul clone). En effet, si l'expansion des lymphocytes T CD8⁺ dans les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH de classe II se produit suite à la rencontre d'un antigène bien particulier, on peut s'attendre à ce qu'un seul ou bien quelques clones des lymphocytes T CD8⁺ prolifèrent. Si cette expansion est due à un autre mécanisme, comme un manque dans la régulation négative qui résulte en l'activation, on peut s'attendre à une expansion générale de tous les lymphocytes T CD8⁺. Pour vérifier la représentation clonale des lymphocytes T CD8⁺ chez les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH de classe II, nous avons analysé l'expression des différentes chaînes variables β (V β s) du TCR. Chez les souris de la souche C57/BL6, les lymphocytes exprimant les chaînes V β s 2, 3, 4, 5.1 et 5.2, 6, 7, 8.1 et 8.2, 8.3, 9, 10^b, 11, 12, 13 et 14 sont présents, tandis que la chaîne V β 17a sert de contrôle négatif, car les lymphocytes T n'expriment pas cette chaîne dans ces souris. Lorsqu'on analyse l'expression des chaînes V β s sur les lymphocytes T CD8⁺, en terme de nombre absolu, toutes les sous-populations de lymphocytes T exprimant les V β s sont augmentées (**Tableau 2**). On est donc en présence d'une expansion polyclonale des lymphocytes T CD8⁺. Il est cependant intéressant de noter que l'expansion polyclonale semble quand même favoriser les lymphocytes T CD8⁺ exprimant certaines chaînes V β s. C'est le cas des lymphocytes T CD8⁺ qui expriment la chaîne V β 8.3 qui sont 1.5 fois plus fréquents chez les souris Tg que chez les souris Ctrl (**Figure 14 A**). Finalement, lorsqu'un TCR interagit avec le

CMH, on remarque une diminution de l'expression du TCR à la surface cellulaire. On observe un phénomène semblable chez les lymphocytes T CD8⁺ de la rate des souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH de classe II. On remarque que plus la fréquence d'un clone est augmentée par rapport au contrôle, plus il y a une diminution de l'expression à la surface cellulaire de cette chaîne V β (**Figure 14 B**). Prenons pour exemple les lymphocytes T qui expriment la chaîne V β 8.3, ces lymphocytes T ont une fréquence très augmentée et également une grande diminution d'expression de cette chaîne V β à la surface cellulaire. Par contre, les lymphocytes T qui expriment la chaîne V β 5.1-5.2 ont une fréquence diminuée et seulement une faible diminution du TCR à leur surface. Nous avons également étudié la représentation clonale des lymphocytes T CD4⁺ chez les souris Tg et Ctrl déficientes au niveau du CMH de classe I, et dans ce cas aucune différence n'a été observée entre les lymphocytes T CD4⁺ Tg et Ctrl.

Tableau 2. Expansion polyclonale des lymphocytes T CD8⁺ au niveau de la rate des souris CMH II -/- de la lignée B7.2mod Ctrl n=5 et Tg n=9. Nombre absolu (X 10⁶) de lymphocytes T CD8⁺ exprimant les différentes chaînes de Vβs marquées au FITC.

VBs	Ctrl	Tg
2	0.88 +/- 0.13	5.36 +/- 0.92
3	0.46 +/- 0.03	4.84 +/- 1.64
4	0.76 +/- 0.06	5.88 +/- 1.60
5.1-5.2	2.48 +/- 0.18	11.32 +/- 1.29
6	1.34 +/- 0.06	6.23 +/- 0.86
7	0.69 +/- 0.04	3.47 +/- 0.59
8.1-8.2	2.55 +/- 0.20	18.11 +/- 1.43
8.3	1.05 +/- 0.13	10.44 +/- 0.79
9	0.52 +/- 0.08	4.35 +/- 0.48
10 ^b	0.58 +/- 0.03	3.87 +/- 0.74
11	1.05 +/- 0.13	7.04 +/- 0.90
12	0.60 +/- 0.03	5.17 +/- 0.99
13	0.64 +/- 0.08	3.04 +/- 0.38
14	0.76 +/- 0.21	3.43 +/- 0.86
17a	0.14 +/- 0.06	1.40 +/- 0.83

Figure 14. Expression des chaînes V β s chez les lymphocytes T CD8⁺ dans la rate de souris CMH II -/- de la lignée B7.2mod, résultats représentatifs de Ctrl n=5 et Tg n=9. (A) Fréquence d'expression des chaînes V β s maruqages des chaînes V β s FITC, sélection sur les lymphocytes T CD8⁺ de la rate * p<0.005. (B) Niveau d 'expression des chaînes V β s 5.1-5.2, 8.1-8.2 et 8.3, à la surface cellulaire sélection sur les lymphocytes T CD8⁺, marquages chaînes V β s au FITC.

3.8 Expansion périphériques des lymphocytes T CD8⁺

L'expansion observée chez les lymphocytes T CD8⁺ des souris B7.2 Tg déficientes en CMH de classe II peut-être périphérique ou bien se produire au cours du développement des lymphocytes T dans le thymus. Pour déterminer si l'expansion des lymphocytes T CD8⁺ observée en périphérie se produit d'abord au thymus, nous avons marqué à l'aide d'anticorps fluorescents les co-récepteurs CD4 et CD8 au niveau du thymus des souris Tg et Ctrl déficientes en CMH de classe II. Les résultats démontrent que dans le thymus la fréquence des lymphocytes T CD8⁺ chez les souris Tg n'est pas différente de celle des souris Ctrl (**Figure 15**). De plus, contrairement à ce que nous avons observé dans la rate, aucune différence dans la fréquence de l'expression des chaînes V β du TCR n'a été observée entre les thymocytes des souris B7.2 Tg et Ctrl. Ces résultats indiquent que l'expansion des lymphocytes T CD8⁺ dans les souris B7.2 Tg déficientes en CMH de classe II est un phénomène qui a son origine en périphérie.

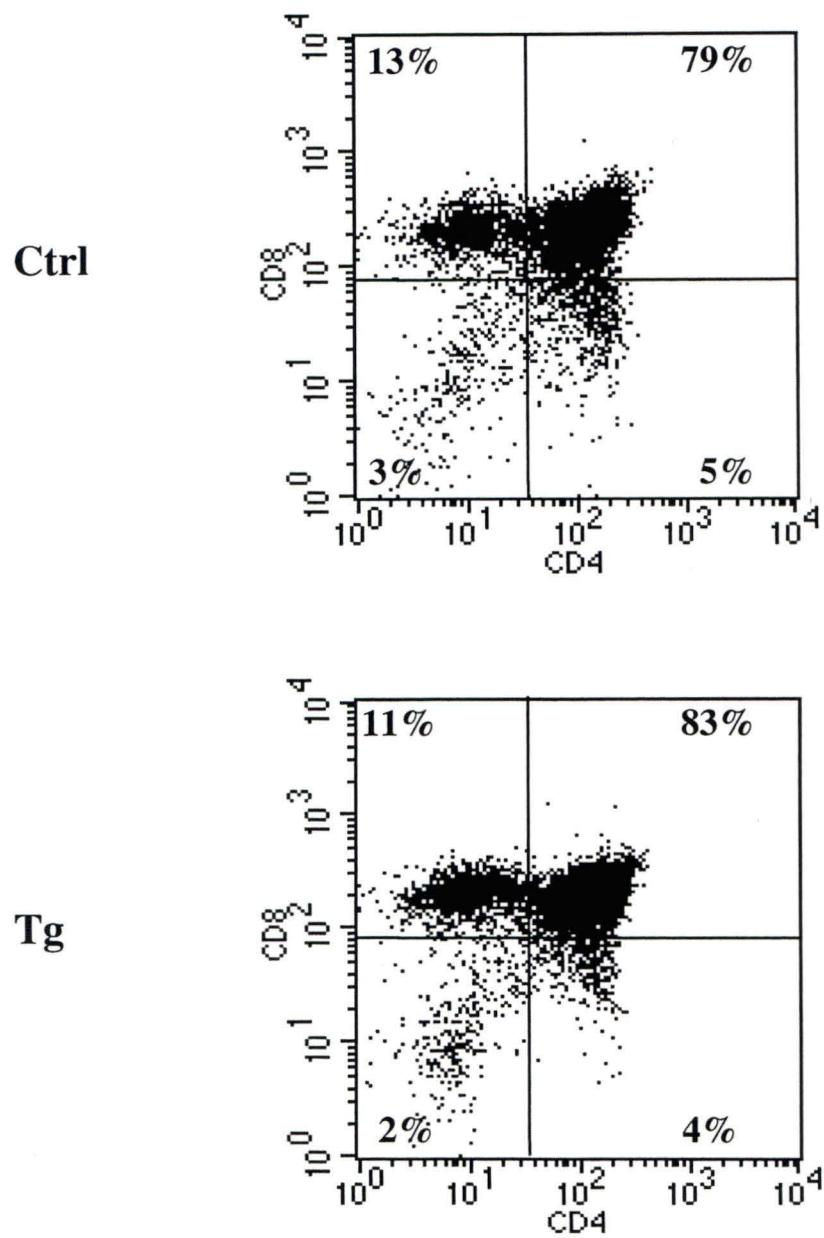


Figure 15. Profil représentatif des lymphocytes T CD4⁺ et des lymphocytes T CD8⁺ dans le thymus des souris CMH II ^{-/-} de la lignée B7.2mod Ctrl n=3 et Tg n=6. Sélection sur les lymphocytes, marquage CD4 FITC et CD8 PE.

3.9 Expression du CTLA-4 sur les lymphocytes T CD8⁺ B7.2 Tg

Comme mentionné dans l'introduction (section 1.2.2), 24 à 48 heures suivant l'activation des lymphocytes T, il y a induction de l'expression de la molécule CTLA-4 à la surface de ces derniers. Le CTLA-4 joue un rôle dans la régulation négative de l'activation des lymphocytes T. Dans les cas des souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH de classe II, on observe une très grande expansion des lymphocytes T CD8⁺. Nous avons donc vérifié s'il y avait présence ou non du CTLA-4 dans les lymphocytes T CD8⁺ des souris Tg. Pour marquer le CTLA-4, on doit d'abord perméabiliser les cellules, puisque le CTLA-4 se retrouve principalement dans des vésicules intracellulaires. Par la suite, on peut détecter la molécule à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-CTLA-4 fluorescent. Effectivement, 37.5% des lymphocytes T CD8⁺ CD44^{élevé} dans la rate des souris Tg expriment le CTLA-4, comparativement à seulement 18% chez les souris Ctrl (**Figure 16**). Si l'on regarde au niveau des lymphocytes T CD8⁺ seul, 33% des cellules T CD8⁺ des souris Tg expriment le CTLA-4, comparativement à 8% pour les cellules T CD8⁺ des souris Ctrl. Ces résultats indiquent que le niveau d'expression de la molécule CTLA-4 est plus élevé chez les lymphocytes T CD8⁺ Tg que chez les lymphocytes T CD8⁺ Ctrl. De plus, le niveau d'expression de la molécule CTLA-4 est plus élevé chez les lymphocytes T CD8⁺ qui ont un phénotype mémoire.

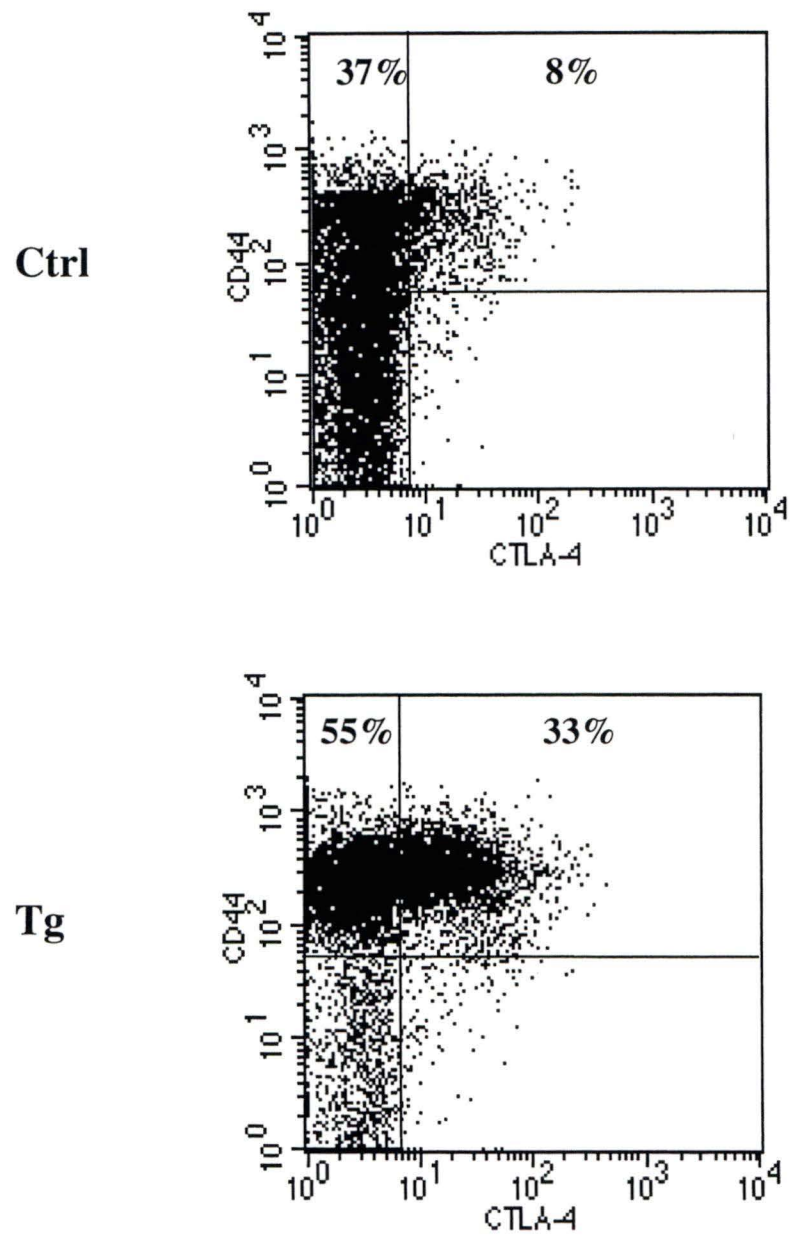


Figure 16. Profil représentatif de l'expression du CTLA-4 sur les lymphocytes T CD8⁺ de la rate des souris CMH II ^{-/-} de la lignée 27, Ctrl n=3 et Tg n=3. Marquage CTLA-4 PE et CD44 biot + SA CyC.

3.10 Souris B7.2low Tg déficientes dans l'expression des molécules du CMH de classe II

Afin de déterminer si l'expansion des lymphocytes T CD8⁺ observée chez les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH de classe II est une conséquence de l'élimination des lymphocytes B par les lymphocytes T CD8⁺, nous avons généré des souris B7.2low CMH de classe II déficientes. Chez les souris de la lignée B7.2low, on retrouve le même niveau d'expression de la molécule B7.2 sur les lymphocytes T, mais l'expression de B7.2 n'est pas détectée sur les lymphocytes B. Il n'y a pas élimination des lymphocytes B dans la moelle osseuse ou en périphérie dans les souris B7.2low, puisque cette élimination requiert l'expression de la molécule B7.2 sur les lymphocytes B (Fournier et al., 1997). Les résultats obtenus sont très intéressants puisque dans la rate des souris B7.2low Tg déficientes au niveau du CMH de classe II, on observe quand même une grande expansion des lymphocytes T CD8⁺, tout à fait similaire à celle retrouvée dans les souris B7.2mod et B7.2hi Tg déficientes en CMH de classe II, mais par contre, aucune diminution du nombre de lymphocytes B n'est observée (**Figure 17**). Nous avons également observé un changement du phénotype des lymphocytes T CD8⁺ des souris B7.2low. Comme dans le cas des lymphocytes T CD8⁺ de la lignée transgénique B7.2mod, les lymphocytes T CD8⁺ de la lignée B7.2low ont presque tous un phénotype mémoire. Ils ne démontrent aucun signe d'activation précoce et ils ont diminué l'expression à leur surface des molécules CD8 et CD28 (**Figure 18 A, B et C**). De plus, 25% des lymphocytes T CD8⁺ de la lignée B7.2low expriment l'IFN γ , ce qui est similaire aux résultats obtenus avec les lymphocytes de la lignée B7.2mod (**Figure 19**).

Finalement, 60% des lymphocytes T CD8⁺ CD44^{élevé} Tg expriment la molécule CTLA-4 (**Figure 20**). Donc, malgré le fait qu'il n'y ait aucune élimination des lymphocytes B, les lymphocytes T CD8⁺ dans les souris B7.2^{low} subissent également une très grande expansion et possèdent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de cellules mémoires.

Ces résultats montrent que l'interaction entre B7.2 sur les lymphocytes B et le CD28 chez les lymphocytes T CD8⁺ des souris Tg n'est pas responsable des caractéristiques retrouvées au niveau des lymphocytes T CD8⁺. De plus, comme le même phénotype se retrouve dans les trois lignées B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH de classe II, on peut affirmer que cette expansion de lymphocytes T CD8⁺ mémoires est associée avec l'expression de B7.2 sur les lymphocytes T. En effet, il s'agit du dénominateur commun qui caractérise les trois lignées B7.2 Tg (Fournier et al., 1997). Enfin, il est important de souligner que cette expansion phénoménale de lymphocytes T CD8⁺ mémoires se produit uniquement dans les souris B7.2 Tg qui sont déficientes au niveau du CMH de classe II et qui sont incapables de générer des lymphocytes T CD4⁺. Même si en présence de lymphocytes T CD4⁺ les souris B7.2 Tg ont une légère diminution du ratio de lymphocytes T CD4⁺/CD8⁺, comparativement aux souris non-transgéniques (Fournier et al., 1997; Yu et al., 2000), l'altération dans l'homéostasie des lymphocytes T CD8⁺ atteint des proportions phénoménales en l'absence d'expression de molécules du CMH de classe II.

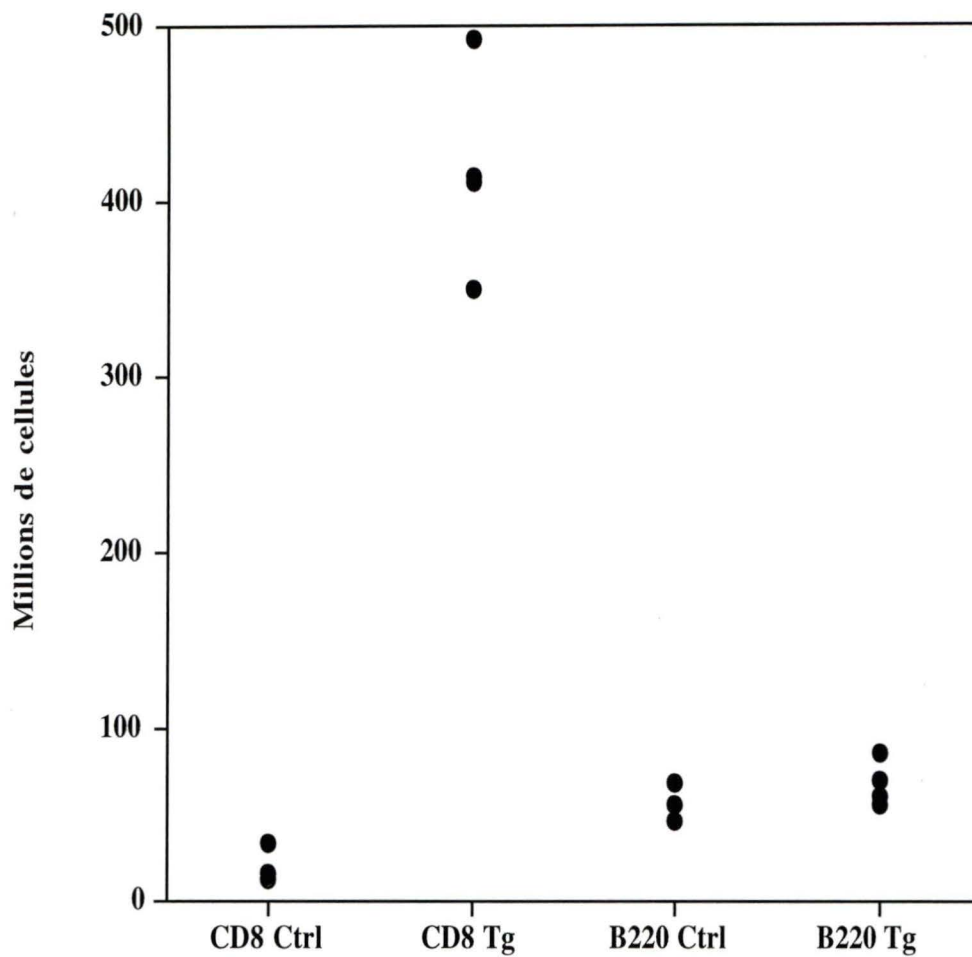
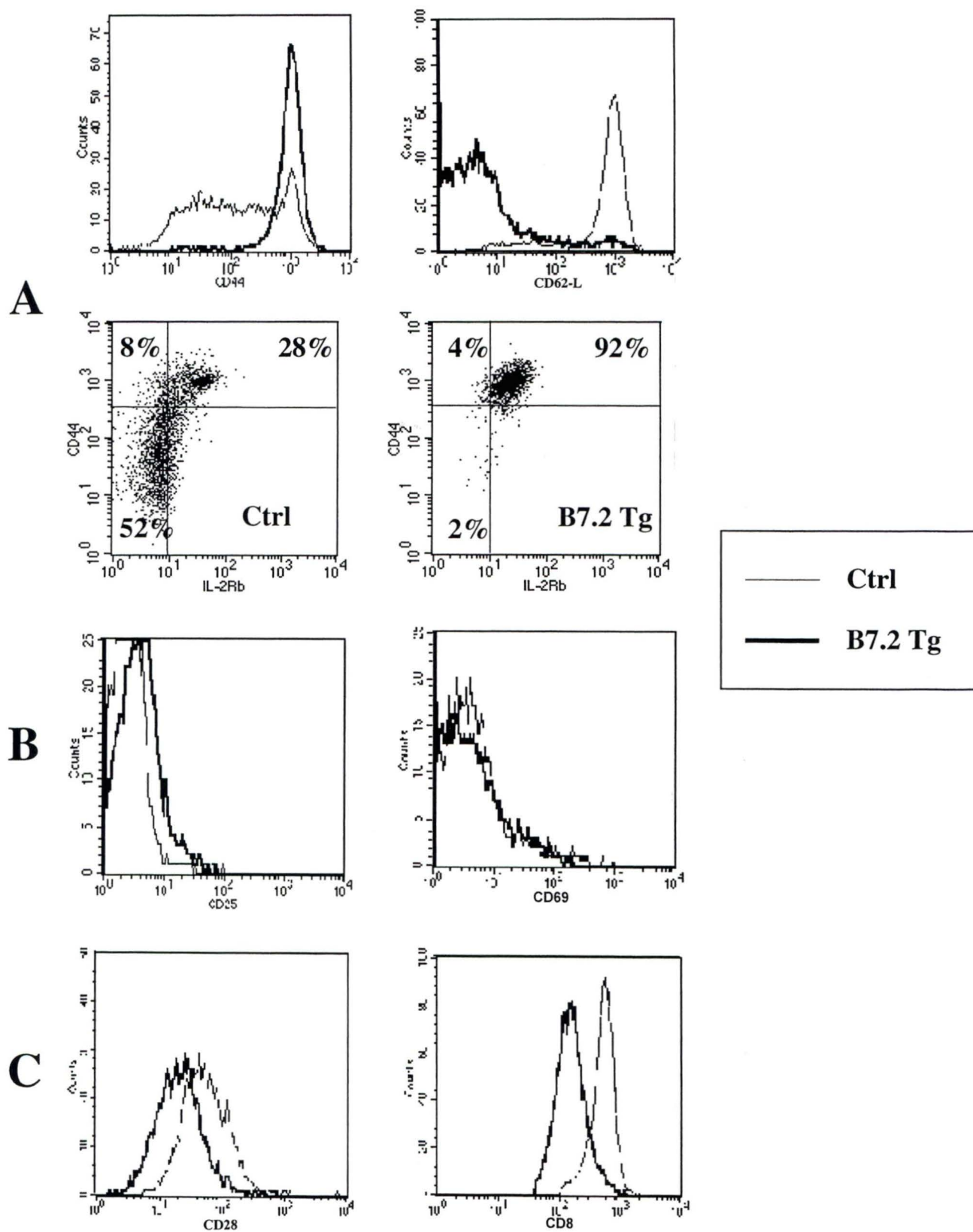


Figure 17. Analyse des lymphocytes B et des lymphocytes T CD8⁺ au niveau de la rate chez les souris CMH II^{-/-} lignée B7.2low. Nombre absolu des lymphocytes B et des lymphocytes T CD8⁺ (sélection sur les lymphocytes) les lymphocytes B sont marqués avec B220 PE et les lymphocytes T CD8⁺ sont marqués avec CD8 FITC

Figure 18. Phénotype représentatif des lymphocytes T CD8⁺ de la rate des souris CMH II^{-/-} de la lignée B7.2low Ctrl n=3 et Tg n=4 (A) Sélection sur les lymphocytes T CD8⁺ marquage (CD44 biot, CD62L biot et IL-2R β biot) + SA CyC (B) Sélection sur les lymphocytes T CD8⁺ marquage (CD25 biot et CD69 biot) + SA CyC. (C) Sélection sur les lymphocytes marquage, CD8 PE et anti-CD28 (37N) + goat anti-hamster FITC.



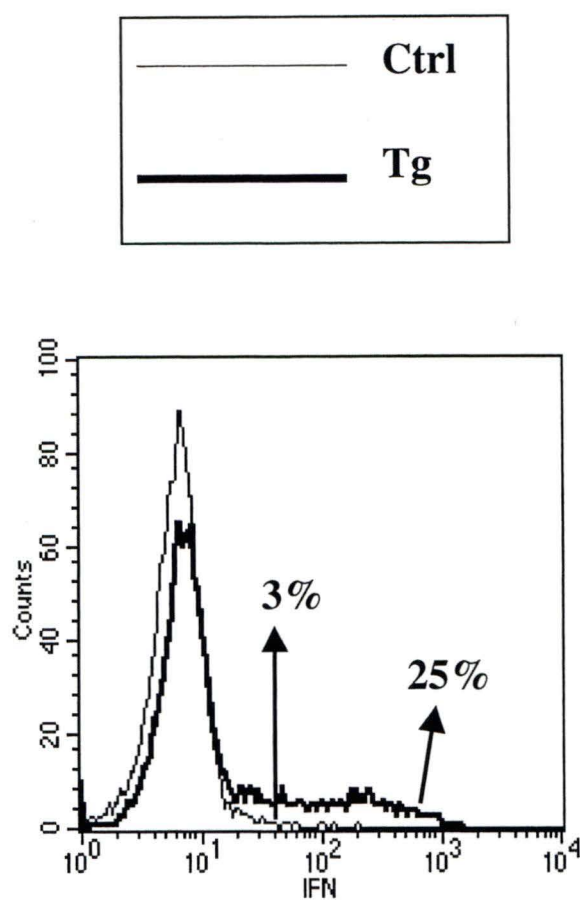


Figure 19. Profil représentatif de la détection d'IFN γ intracellulaires chez les lymphocytes T CD8 $^{+}$ de la rate des souris CMH II $^{-/-}$ lignée B7.2mod Ctrl n=1 et Tg n=2 après stimulation avec 5 μ g/ml anti-CD3 soluble pendant 3 heures en présence de brefeldine 20 μ g/ml. Sélection sur les lymphocytes T CD8 $^{+}$ marquages IFN γ FITC.

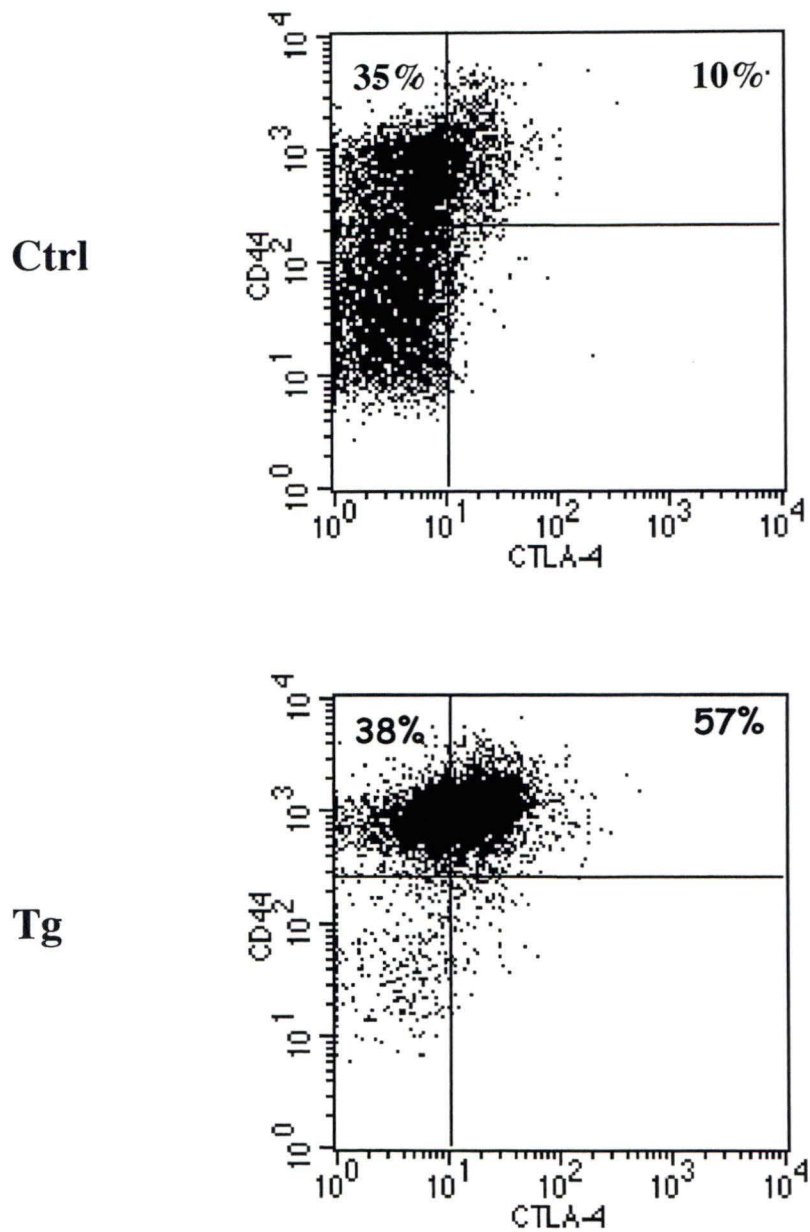


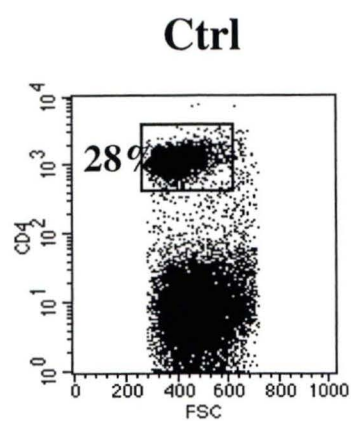
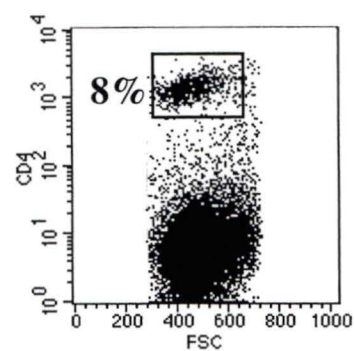
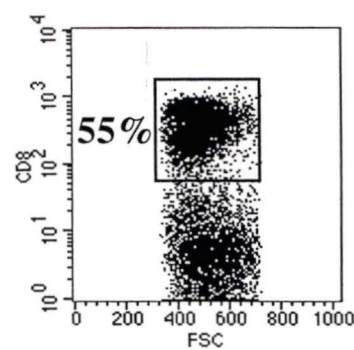
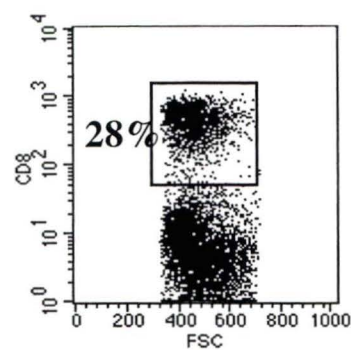
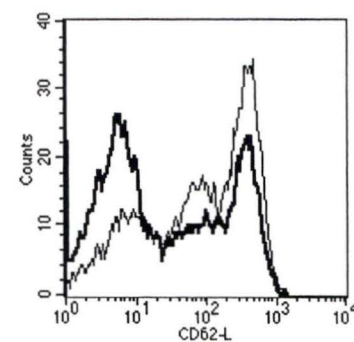
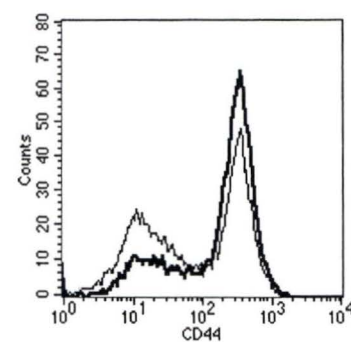
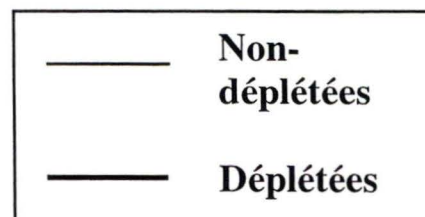
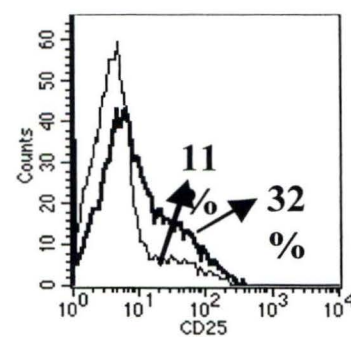
Figure 20. Profil représentatif de l'expression du CTLA-4 sur les lymphocytes T CD8⁺ de la rate des souris CMH II ^{-/-} de la lignée 31, Ctrl n=1 et Tg n=2. Marquage CTLA-4 PE et CD44 biot + SA CyC.

3.11 Déplétion des lymphocytes T CD4⁺ chez les souris B7.2 Tg de la lignée 27

Une hypothèse qui pourrait expliquer l'expansion des lymphocytes T CD8⁺ dans les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH de classe II, est l'absence de lymphocytes T CD4⁺ immuno-régulateurs. Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, les lymphocytes T CD4⁺ immuno-régulateurs seraient impliqués au niveau de la tolérance périphérique. Nous croyons que l'absence de cette population régulatrice dans les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH de classe II résulterait en un manque important des mécanismes contrôlant la prolifération des lymphocytes T CD8⁺. Pour vérifier cette hypothèse nous avons effectué une déplétion *in vivo* des lymphocytes T CD4⁺ dans une souris B7.2mod. Cette déplétion s'effectue en injectant à intervalles réguliers dans la cavité péritonéale un anticorps monoclonal, le GK1.5, dirigé contre la molécule CD4. Comme on peut le constater, après 27 jours de déplétion, la fréquence des lymphocytes T CD4⁺, au niveau de la rate, passe de 28% à 8% (**Figure 21 A**). La déplétion est donc partielle, ce qui correspond à ce qui est rapporté dans la littérature à ce sujet. En effet, lors de la déplétion avec le GK1.5, seulement la population de lymphocytes T CD4⁺ naïfs est éliminée (Chace et al., 1994). La diminution de la fréquence des lymphocytes T CD4⁺ dans les souris qui ont subi le traitement avec l'anticorps monoclonale GK 1.5 se traduit évidemment par une augmentation de la fréquence des lymphocytes T CD8⁺, ces derniers passant de 30% à une fréquence de 55% (**Figure 21 B**). De plus, ces lymphocytes T CD8⁺ possèdent une proportion légèrement plus élevée de cellules mémoires que les lymphocytes T CD8⁺ pour lesquels il n'y a pas eu de déplétion. Ce changement de

phénotype se traduit par l'augmentation de l'expression du CD44 et la diminution de l'expression du CD62L (**Figure 21 C**). Malheureusement ces expériences ne nous permettent pas d'observer une lymphoprolifération des lymphocytes T CD8⁺ aussi spectaculaire que celle observée dans les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH de classe II. Une explication possible pour ce résultat est qu'il n'y a pas de disparition complète des lymphocytes T CD4⁺ dans les souris qui ont subi le traitement avec l'anticorps anti-CD4. De plus, il est important de noter que les lymphocytes T CD4⁺ qui ont échappé à la déplétion, possèdent un phénotype de cellules immuno-régulatrices, soit CD4⁺ et CD25⁺ (**Figure 21 D**). Malgré tout, le nombre de lymphocytes T CD8⁺ augmente, ainsi que la proportion des lymphocytes T CD8⁺ mémoire dans les souris B7.2 Tg qui ont été traitées *in vivo* avec l'anticorps anti-CD4, ce qui suggère que l'absence de lymphocytes T CD4⁺ immuno-régulateurs pourrait être à l'origine de l'altération de l'homéostasie des lymphocytes T CD8⁺ dans les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH de classe II.

Figure 21. Phénotype représentatif de la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ avec le GK1.5 chez les souris Tg de la lignée B7.2mod non-déplétées n=2 et déplétées n=4. (A) Sélection sur les lymphocytes, fréquence des lymphocytes T CD4⁺, marquage CD4 PE. (B) Sélection sur les lymphocytes, fréquence des lymphocytes T CD8⁺, marquage CD8 PE. (C) Sélection sur les lymphocytes T CD8⁺ marquage (CD44 biot et CD62L biot) + SA CyC. (D) Sélection sur les lymphocytes T CD4⁺ marquage CD25 FITC.

A**B7.2 Tg****B****C****D**

4. Discussion et conclusion

Nos résultats démontrent clairement que les lymphocytes T $CD4^+$ ainsi que les lymphocytes T $CD8^+$ sont capables d'éliminer les lymphocytes B chez les souris Tg. La disparition des lymphocytes B semble prendre origine au niveau même de la moelle osseuse, là où les lymphocytes B se développent. Cette élimination précoce des lymphocytes B expliquerait pourquoi leur nombre est autant réduit dans les organes périphériques, comme dans la rate et les ganglions périphériques. La signification physiologique du phénomène d'élimination des lymphocytes B qui expriment de façon constitutive B7.2 par les lymphocytes T en absence d'antigène étranger n'est pas connue. On a suggéré que cela pouvait représenter un mécanisme de tolérance pour éliminer les lymphocytes B qui reconnaissent des antigènes du soi au cours de leur développement (Fournier et al., 1997; Van Parijs., et al 1997). Si ces cellules n'étaient pas éliminées, la présence d'un haut niveau de la molécule B7.2 pourrait activer des lymphocytes T qui reconnaissent les peptides du soi présentés à leur surface, et ainsi conduire au développement de maladies auto-immunes. Il existe quand même une différence d'efficacité entre les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ dans l'élimination des lymphocytes B. En effet, chez les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH I, on ne retrouve pratiquement plus de cellules B, tandis que chez les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH II, le nombre de lymphocytes B est diminué dans la moelle osseuse et dans la rate, mais aucunement dans les ganglions périphériques. Les lymphocytes B périphériques, chez les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH II, ont un phénotype immature. Une explication possible serait que l'élimination des lymphocytes

B par les lymphocytes T $CD4^+$ se ferait très tôt dans le développement des cellules B, tandis que les lymphocytes T $CD8^+$ interviendraient à un stade plus tardif de la maturation des lymphocytes B. Ceci aurait pour effet de permettre à certains lymphocytes B de quitter la moelle osseuse avant même d'avoir terminé leur maturation et de se retrouver dans les organes périphériques. Certaines études indiquent que la rate peut être un site de maturation des lymphocytes B. De plus, des lymphocytes B avec un phénotype immature ont été retrouvés dans les ganglions périphériques suggérant qu'il pourrait y avoir maturation des lymphocytes B en périphérie ailleurs que dans la rate (Rolink et al., 1998).

En plus d'éliminer les lymphocytes B avec une efficacité différente, les lymphocytes T $CD8^+$ des souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH II et les lymphocytes T $CD4^+$ des souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH I réagissent différemment. Le nombre de lymphocytes T $CD8^+$ augmente de façon phénoménale en périphérie, tandis que le nombre de lymphocytes T $CD4^+$ diminue légèrement. La diminution du nombre de lymphocytes T $CD4^+$ dans les organes lymphoïdes périphériques des souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH I peut être corrélée avec la disparition des lymphocytes B. En effet, les lymphocytes T $CD4^+$ naïfs ont besoin pour survivre en périphérie de signaux provenant de la liaison de leur TCR avec des peptides du soi présentés par un CMH II (Janeway et al., 1998). On retrouve le CMH II majoritairement chez les CPA (cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes B). Il a été proposé que le signal nécessaire pour la survie des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs provenait de leur interaction avec des cellules dendritiques (Brocker, 1997 ; Brocker, 1999). Nos expériences démontrent que la diminution des lymphocytes B, dans les souris

B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH I, a une incidence sur la survie des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs en périphérie, puisqu'on retrouve un nombre réduit de ces derniers. Ce résultat ne va pas à l'encontre de la théorie qui dit que les cellules dendritiques sont capables de fournir un signal de survie aux lymphocytes T $CD4^+$; il soulève cependant la possibilité que les lymphocytes B pourraient également jouer un rôle semblable.

Comme on observe une diminution massive des lymphocytes B, attribuée aux lymphocytes T $CD4^+$, il était intéressant de déterminer si l'élimination des lymphocytes B était accompagnée de changement de phénotype au niveau des lymphocytes T $CD4^+$. En fait, aucun changement phénotypique n'a été observé, à l'exception d'une diminution de l'expression à la surface du CD28. Il est déjà connu que le CD28 est internalisé suite à son interaction avec ses ligands B7.1 et B7.2 (Hwang et al., 2000). Cette diminution est due à la liaison de la molécule B7.2 exprimée à de hauts niveaux sur les lymphocytes T $CD4^+$ avec le récepteur CD28, mais non à l'interaction avec la molécules B7.2 exprimée sur les lymphocytes B. En effet, cette diminution de l'expression du CD28 est déjà apparente au niveau du thymus. Pour ce qui est de la représentation clonale des lymphocytes T $CD4^+$, elle ne change pas même lors de l'élimination des lymphocytes B.

Contrairement aux lymphocytes T $CD4^+$, les lymphocytes T $CD8^+$ des souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH II subissent une expansion phénoménale dans les organes lymphoïdes périphériques. La rate ainsi que les ganglions périphériques doublent et parfois même triplent de volume dans ces souris. De plus, on observe un changement de phénotype des lymphocytes T $CD8^+$. Près de 100% des lymphocytes T $CD8^+$ ont un phénotype mémoire ($CD44^{\text{élevé}}$, $CD45RB^{\text{modéré}}$, $CD62-L^{\text{faible}}$ et $IL-2R\beta^{\text{modéré}}$) et cela sans que l'on observe une augmentation des marqueurs d'activation précoce comme CD25 et

CD69 (Dutton et al., 1998). On remarque aussi une diminution du niveau d'expression du TCR, du CD28 ainsi que du CD8 à la surface des lymphocytes T CD8⁺ B7.2 Tg. La diminution de l'expression de ces molécules à la surface cellulaire suggère que les lymphocytes T CD8⁺ ont reçu un signal via l'interaction de leur TCR et du CD28 avec leurs ligands. Du point de vue fonctionnel, on remarque un plus grand potentiel cytotoxique chez les lymphocytes T CD8⁺ B7.2 Tg, que chez les lymphocytes T CD8⁺ Ctrl. En effet, les lymphocytes T CD8⁺ B7.2 Tg expriment l'ARNm de plusieurs molécules effectrices comme la perforine, le fas ligand, le granzyme B et l'IFN γ . On détecte également chez environ 30% des lymphocytes T CD8⁺ B7.2 Tg la présence d'IFN γ intracellulaire suite à la stimulation des lymphocytes T CD8⁺ via le CD3 pour une très courte période de temps. La présence d'IFN γ intracellulaire est caractéristique de cellules T CD8⁺ mémoires fonctionnelles, puisque suite à une aussi courte stimulation via leur TCR, les lymphocytes T CD8⁺ naïfs sont incapables de produire de l'IFN γ (Murali-Krishan et Ahmed, 2000; Goldrath et al., 2000). Les lymphocytes T CD8⁺ B7.2 Tg infiltrent aussi les organes non-lymphoïdes. La meilleure capacité des cellules mémoires à migrer en dehors d'organes lymphoïdes expliquerait la présence des lymphocytes T CD8⁺ à l'intérieur d'organes non-lymphoïdes. Cela pourrait également expliquer le fait que les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH II ont une longévité moins grande que des souris Ctrl. En effet, les lymphocytes cytotoxiques qui infiltrent les organes possèdent un bagage effecteur complet et ceux-ci ont la capacité de détruire les cellules, même celles du soi. Il est intéressant de noter que l'infiltration des lymphocytes T CD8⁺ B7.2 Tg semble beaucoup plus grande au niveau du système nerveux central que dans n'importe quel autre organe. Ce résultat est en accord avec deux

autres études qui ont démontré une recirculation et/ou accumulation préférentielle des lymphocytes T CD8⁺ au niveau du système nerveux central (Carson et al., 1999; Brabb et al., 2000).

Une autre caractéristique intéressante est que les lymphocytes T CD8⁺ s'expandent de façon polyclonale. En effet, le nombre absolu de chacune des chaînes Vβs est augmenté. Par contre, lorsqu'on regarde au niveau de la fréquence de représentation des différents Vβs, on remarque que certaines fréquences sont changées de façon significative par rapport au Ctrl. C'est le cas de la fréquence des chaînes Vβs 5.1-5.2 et 6 qui est diminuée en faveur de la chaîne Vβ 8.3. L'augmentation de la fréquence de certains lymphocytes T, comme ceux qui expriment la chaîne Vβ 8.3, se traduit par une plus grande baisse de l'expression à la surface cellulaire de cette chaîne Vβ. Cela peut avoir comme signification que certains lymphocytes T CD8⁺ B7.2 Tg comme ceux exprimant le Vβ 8.3 sont favorisés dans la reconnaissance d'un antigène par rapport à sa représentation originale chez une souris Ctrl. Finalement, la caractérisation des lymphocytes T CD8⁺ chez les souris B7.2Tg déficientes au niveau du CMH II démontre une expression augmentée de l'autre récepteur pouvant lier le B7.2 et cela avec 20 fois plus d'affinité que le CD28 : il s'agit de la molécule CTLA-4. Cette molécule est reconnue comme étant une molécule inhibitrice de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T. Chez les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH II, plus du tiers des cellules CD8⁺ expriment le CTLA-4 et pourtant on remarque une grande expansion des lymphocytes cytotoxiques. Il semble donc que le CTLA-4 ne joue pas son rôle dans la régulation négative de l'activation des lymphocytes T CD8⁺. Il est déjà connu que le CTLA-4 régule la réponse primaire et secondaire des lymphocytes T CD4⁺ lors de leur

activation par un peptide spécifique (Chambers et al., 1999), ce qui n'est pas le cas pour les lymphocytes T CD8⁺ (Chambers et al., 1998). En effet, une théorie veut que le CTLA-4 joue un rôle seulement dans la régulation négative de la réponse secondaire des lymphocytes T CD8⁺.

Comme mentionné dans l'introduction, l'expression du transgène B7.2 sur les lymphocytes B est indispensable pour qu'il y ait élimination de ces derniers. Une question demeure. Est-ce que l'expression du transgène B7.2 sur les lymphocytes B est également impliquée au niveau de l'expansion et du changement de phénotype des lymphocytes T CD8⁺ des souris CMH II déficientes? Pour déterminer si l'expansion des lymphocytes T CD8⁺ B7.2 Tg chez les souris CMH II déficientes est une conséquence de l'élimination des lymphocytes B ou bien de l'interaction entre la molécule B7.2 sur les lymphocytes T avec le CD28, nous avons généré des souris CMH II déficientes de la lignée transgénique B7.2low. Ces souris n'expriment pas le transgène B7.2 sur les lymphocytes B mais expriment le transgène B7.2 sur les lymphocytes T à des niveaux identiques aux deux autres lignées B7.2 transgéniques. Comme attendu, dans les souris B7.2low déficientes au niveau du CMH II, il n'y a pas élimination des lymphocytes B, puisque cette élimination nécessite l'expression de B7.2 sur les lymphocytes B. Malgré tout, on remarque une très forte lymphoprolifération des cellules T CD8⁺. L'expansion des lymphocytes T CD8⁺ est également accompagnée par un changement de phénotype des cellules naïves vers des cellules mémoires, ainsi qu'une diminution d'expression du CD28 et du CD8 à la surface cellulaire. Comme chez les souris des lignées B7.2hi et B7.2mod, les lymphocytes T CD8⁺ B7.2 Tg de la lignée de souris B7.2low ne présentent aucun signe d'activation précoce. Les lymphocytes T CD8⁺ de la lignée de souris

B7.2low, présentent environ le même niveau d'expression de la cytokine IFN γ que celui retrouvé chez les lymphocytes T CD8 $^{+}$ de la lignée de souris B7.2mod. Finalement, le niveau d'expression du CTLA-4 sur les lymphocytes cytotoxiques est de plus de 50%. Toutes ces informations nous démontrent qu'il existe une similitude entre les lymphocytes T CD8 $^{+}$ des différentes lignées de souris B7.2Tg déficientes au niveau du CMH II. On peut donc en déduire que l'expansion, le changement de phénotype et l'état fonctionnel cytotoxique des lymphocytes T CD8 $^{+}$ chez les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH II sont dus à l'expression de la molécule B7.2 sur les lymphocytes T, plutôt que sur les lymphocytes B et que le phénomène observé n'est aucunement la conséquence de l'élimination des lymphocytes B.

Nous sommes donc en présence d'une expansion périphérique et polyclonale des lymphocytes T CD8 $^{+}$ mémoires, non-activés, effecteurs et ayant la possibilité d'infiltrer les organes non-lymphoïdes. Pour qu'un lymphocyte T CD8 $^{+}$ naïf prolifère et devienne mémoire, il doit obligatoirement recevoir signalisation via le TCR (Tanchot et.al., 1997). Dans notre cas, les souris B7.2 Tg ont été gardées dans un milieu stérile exempt de pathogènes. Il semble donc peu probable qu'elles aient rencontré un antigène étranger. De plus, le phénomène d'expansion des lymphocytes T CD8 $^{+}$ a une incidence de 100% chez les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH II. Une seconde possibilité expliquant un changement de phénotype des lymphocytes T CD8 $^{+}$ naïfs vers un phénotype mémoire, est un changement suite à une prolifération homéostatique. La prolifération homéostatique est un phénomène de maintien de la population lymphocytaire indépendante de la production de cellules T en provenance du thymus. Ce phénomène peut être observé expérimentalement lorsque l'on transfère des lymphocytes

T chez des souris immunodéficientes, comme les souris Rag $-/-$, Scid ou chez des souris irradiées (Murali-Krishna et al., 1999). Dans ces conditions, ce sont des peptides du soi de faibles affinités pour le TCR qui conduisent à la l'expansion des lymphocytes T naïfs (Goldrath Bevan et, 1999). Ces peptides sont les mêmes qui sont présentés aux lymphocytes T immatures lors de la sélection positive dans le thymus et qui leur donnent un signal de survie (Ernst et al., 1999). Un fait intéressant est que lors de la prolifération homéostatique, les lymphocytes T naïfs acquièrent tous un phénotype de cellules mémoires (Goldrath et al., 2000; Surh et Sprent 2000). Lorsque la population totale des cellules T atteint son niveau initial, il y a alors arrêt de la prolifération; dans aucun cas la prolifération homéostatique atteint des niveaux aussi élevés de lymphoprolifération (Goldrath et al., 2000). En effet, la prolifération homéostatique des lymphocytes T arrête toujours chez les souris lymphopéniques lorsque le niveau de lymphocytes redevient normal. Dans notre cas on observe une lymphoprolifération des lymphocytes T CD8⁺ qui atteint des niveaux non-physiologiques. Ceci écarte donc la possibilité que l'on soit en présence d'une prolifération homéostatique.

Deux autres hypothèses n'étant pas mutuellement exclusives demeurent. La première, est qu'il y a absence d'une population immunorégulatrice de lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺, chez les souris B7.2Tg déficientes au niveau du CMH II. L'absence de cette population immunorégulatrice rendrait possible la prolifération et la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ suite à la reconnaissance de peptides du soi. La seconde, est que la liaison de la molécule B7.2Tg sur les lymphocytes T avec ses récepteurs, aurait un effet différentiel sur les lymphocytes T CD8⁺ *versus* les lymphocytes T CD4⁺. Dans ce cas-ci, la liaison de la molécule B7.2 avec son récepteur CD28 sur les lymphocytes T

CD8⁺ aurait pour effet de diminuer le seuil d'activation des lymphocytes T CD8⁺, ce qui résulterait en une prolifération et une différenciation des cellules cytotoxiques face à des antigènes du soi. Dans les souris B7.2 Tg dans lesquelles on retrouve à la fois des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, on a observé un léger débalancement dans le ratio CD4⁺/CD8⁺ en faveur des CD8⁺ (Xu et al., 2000). Cependant, l'augmentation des cellules CD8⁺ n'atteint jamais l'expansion phénoménale observée dans les souris B7.2 déficientes au niveau du CMH II. De plus, ces dernières meurent très jeunes contrairement aux souris B7.2 Tg dans lesquelles on retrouve à la fois des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ qui ont une espérance de vie identique aux souris de type sauvage. Ces résultats suggèrent fortement que les cellules T CD4⁺ sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie des cellules CD8⁺ dans les souris B7.2 Tg.

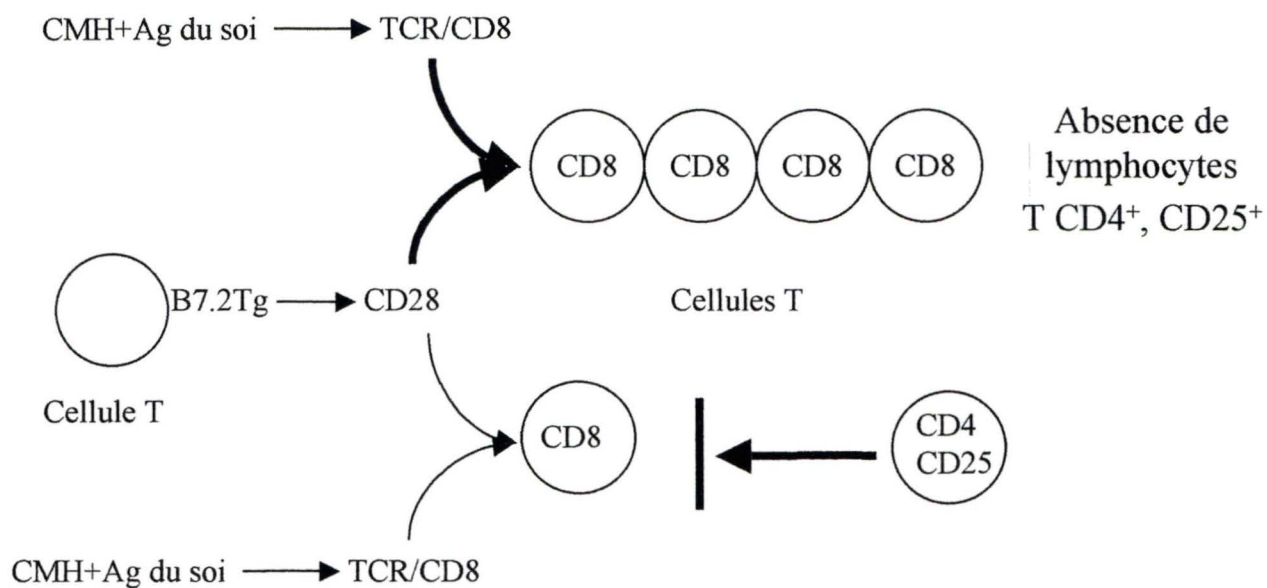
Un des mécanismes de tolérance connu en périphérie est la présence de cellules suppressives, soient les lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺ immunorégulateurs (Shevach, 2000). Cette population cellulaire est absente chez les souris B7.2Tg déficientes au niveau du CMH II. L'absence de cette population pourrait être responsable du fait que les lymphocytes T CD8⁺ prolifèrent de façon incontrôlée. Dans ce cas-ci, la rencontre du TCR chez les lymphocytes T cytotoxiques avec des peptides du soi, présentés par un CMH de classe I, additionnée au signal de costimulation provenant de la liaison de la molécule B7.2Tg présente sur les lymphocytes T CD8⁺ avec le CD28, conduiraient à l'expansion et à la différenciation des cellules cytotoxiques. Comme la population de lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺ n'est pas absente chez les souris B7.2Tg déficientes au niveau du CMH I, les lymphocytes T CD4⁺ n'auraient pas la possibilité de proliférer

contrairement aux lymphocytes T CD8⁺ des souris B7.2Tg déficientes au niveau du CMH II.

Pour vérifier le véritable impact de l'absence des lymphocytes T immunorégulateurs chez les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH II, nous avons déplété les lymphocytes T CD4⁺ chez des souris de la lignée B7.2 Tg mod. Comme il avait déjà été observé (Chace et al., 1994) la déplétion n'est pas à 100% efficace, mais on observe quand même une forte diminution dans la proportion de lymphocytes T CD4⁺ chez les souris B7.2Tg. Le fait que la fréquence des lymphocytes T CD4⁺ diminue semble profiter davantage aux lymphocytes T CD8⁺. Il semble que les lymphocytes T CD8⁺ changent quelque peu de phénotype puisqu'on observe une plus grande proportion de cellules T CD8⁺ CD44^{élevé} et CD62L^{faible}, ce qui est caractéristique des cellules mémoires. Une possibilité pouvant expliquer que l'on n'observe pas une expansion aussi radicale ainsi qu'un changement de phénotype aussi net, est qu'il reste encore beaucoup de lymphocytes T CD4⁺. Lorsqu'on caractérise le phénotype des lymphocytes T CD4⁺ restants, la proportion des cellules T CD4⁺ CD25⁺ est augmentée puisque ces cellules sont plus résistantes à la déplétion par des anticorps (Chace et al., 1994). Les cellules immunorégulatrices non-déplétées peuvent donc jouer leur rôle dans la répression de la prolifération des lymphocytes T CD8⁺. Il nous est donc impossible de conclure de façon certaine que l'absence des lymphocytes T CD4⁺ immunorégulateurs soit la cause de la prolifération et de la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ chez les souris B7.2Tg déficientes au niveau du CMH II. Par contre, le fait qu'il y ait un léger changement de phénotype vers un type mémoire nous donne de bons indices sur l'implication des cellules immunorégulatrices dans le devenir des lymphocytes T CD8⁺ chez les souris

B7.2Tg (**Figure 22**). Une approche ciblant la déplétion de la population de lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺, nous aurait certainement donné une meilleure compréhension de l'importance de ces cellules immunorégulatrices chez les souris B7.2Tg. Pour dépléter ces cellules, on pourrait utiliser la méthode de déplétion *in vivo* qui consiste à injecter chez les souris B7.2Tg, de façon intrapéritonéal et à intervalles réguliers, un anticorps qui cible directement le CD25.

Souris B7.2Tg, CMH II déficientes



Souris B7.2Tg

Figure 22. Modèle hypothétique du rôle des lymphocytes T CD4⁺, CD25⁺ immunorégulateur dans la tolérance périphérique suite à l'activation des lymphocytes T CD8⁺ de souris B7,2 Tg face à des peptides du soi.

La deuxième hypothèse consiste en la possibilité qu'il existe une signalisation différentielle des récepteurs CD28 et/ou CTLA-4 chez les lymphocytes T CD4⁺ *versus* CD8⁺, suite à la liaison de la molécule B7.2. Cette hypothèse n'est pas mutuellement exclusive à la possibilité qu'un manque au niveau de la tolérance périphérique soit également à l'origine de l'expansion et de la différenciation des lymphocytes T CD8⁺.

Des indices d'effets différentiels de la liaison du CTLA-4 sur les lymphocytes T CD4⁺ *versus* CD8⁺ sont déjà décrits dans la littérature. Il est bien connu que les souris déficientes en CTLA-4 meurent rapidement suite à la lymphoprolifération des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Un fait intéressant est que chez les souris déficientes au niveau du CTLA-4 et des lymphocytes T CD4⁺, il n'y a pas de lymphoprolifération des lymphocytes T CD8⁺. De façon contraire, les souris déficientes au niveau du CTLA-4 et des lymphocytes T CD8⁺ meurent rapidement suite à la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ (Chambers et al., 1999).

Comme expliqué précédemment, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ proviendrait de la liaison du TCR avec une molécule du CMH de classe I présentant des peptides du soi ainsi que du signal de costimulation impliquant le transgène B7.2 et le CD28, tous deux retrouvés chez les lymphocytes T. La présence du transgène B7.2 aurait comme effet de réduire le seuil d'activation des lymphocytes T CD8⁺, ce qui rendrait possible leur activation suite à la présentation d'antigènes du soi. L'effet différentiel de la molécule B7.2 pourrait être impliquée à plusieurs niveaux lors de la signalisation des lymphocytes T via leurs récepteurs. Une des possibilités est que le signal suivant la liaison de la molécule B7.2 avec le CD28 a un effet beaucoup plus activateur chez les lymphocytes T CD8⁺ que chez les lymphocytes T CD4⁺. Une autre

possibilité est que le signal inhibiteur de l'activation passant par la liaison de la molécule B7.2 et du récepteur CTLA-4 soit plus efficace chez les lymphocytes T CD4⁺ que chez les lymphocytes T CD8⁺. Certainement que la combinaison des deux effets est également possible (**Figure 23**). Pour notre part, nous avons détecté la présence de la molécule CTLA-4 chez les lymphocytes T CD8⁺ des souris B7.2Tg déficientes au niveau du CMH II, mais comme mentionné précédemment, il ne semble pas y avoir d'incidence sur la prolifération des cellules T cytotoxiques. Il aurait également été intéressant de détecter la présence de la molécule CTLA-4 chez les lymphocytes T CD4⁺ des souris B7.2Tg déficientes au niveau du CMH I, puisque chez celles-ci, la présence de la molécule B7.2 ne conduit pas à une expansion et à une différenciation. Pour vérifier l'hypothèse selon laquelle la liaison de la molécule B7.2Tg exprimée chez les lymphocytes T CD4⁺ avec le CTLA-4 conduit à l'inhibition de leur prolifération, il nous suffirait de bloquer *in vivo*, à l'aide d'un anticorps spécifique, la molécule CTLA-4 chez les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH I. De cette façon, on observerait une lymphoprolifération des lymphocytes T CD4⁺, puisqu'il n'y aurait plus aucun signal inhibiteur d'activation de ces derniers.

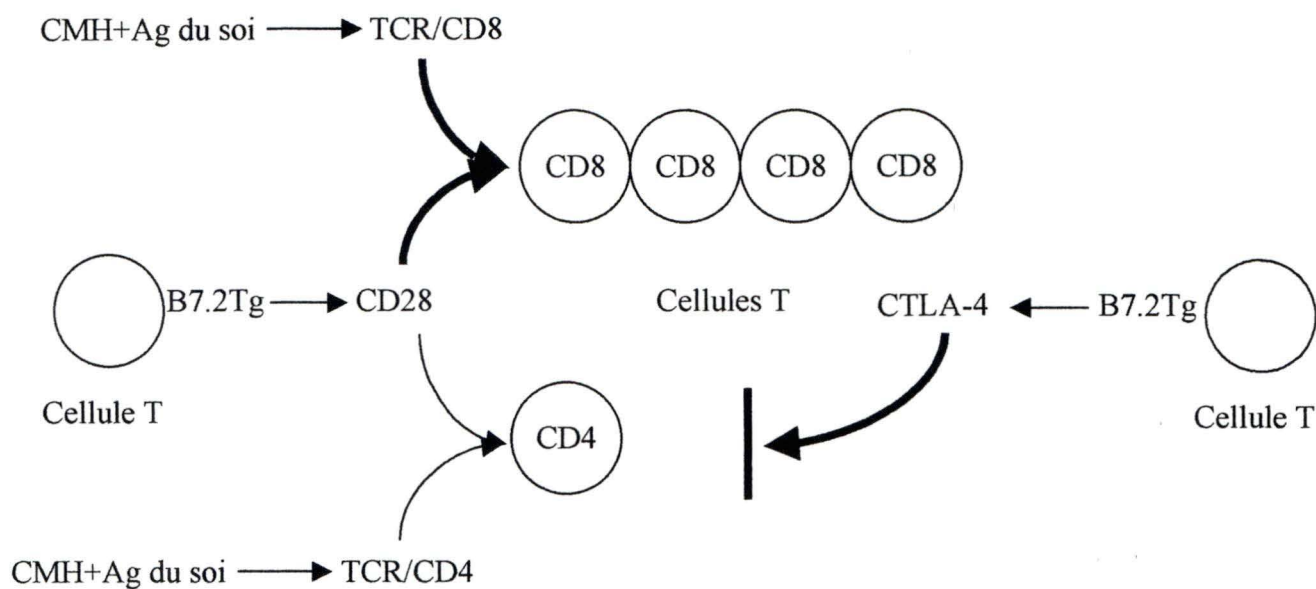


Figure 23. Modèle hypothétique de l'effet différentiel de la liaison de la molécule B7.2 exprimée chez les lymphocytes T avec leur récepteur le CD28 et le CTLA-4. La liaison de la molécule B7.2Tg avec le CD28 résulterait en une expansion périphérique des lymphocytes T CD8⁺, tandis que la liaison de B7.2Tg avec le CTLA-4 résulterait en une inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4⁺.

En conclusion, nos recherches ont permis de démontrer une différence d'efficacité dans l'élimination des lymphocytes B des souris B7.2 Tg par les lymphocytes T CD4⁺ et les lymphocytes T CD8⁺. Les lymphocytes T CD4⁺ étant beaucoup plus efficaces dans l'élimination des lymphocytes B B7.2 Tg que les lymphocytes T CD8⁺. De plus, l'élimination des lymphocytes B ne semble pas avoir de répercussion sur les lymphocytes T CD4⁺ ou les lymphocytes T CD8⁺. En effet, la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ observée chez les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH II ne provient pas de l'élimination des lymphocytes B et on n'observe aucun changement au niveau des lymphocytes T CD4⁺. La prolifération des lymphocytes T CD8⁺ semble se produire suite à la reconnaissance de peptides du soi et par l'abaissement du seuil d'activation à cause de la présence de la molécule B7.2 sur les lymphocytes T. Il demeure évident, lorsque l'on observe la proportion non physiologique que prend l'expansion des lymphocytes T CD8⁺ chez les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH II, qu'il y a un manque soit au niveau de mécanismes de tolérance périphérique et/ou de l'effet inhibiteur de l'activation des lymphocytes T CD8⁺ suite à la signalisation via le CTLA-4. En effet, la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ ne semble pas du tout contrôlée. Il en résulte que les souris B7.2 Tg déficientes au niveau du CMH II ont une espérance de vie plus courte que la moyenne des souris. La molécule B7.2 sur les lymphocytes T CD8⁺ vs CD4⁺ pourrait également jouer un rôle différentiel dans l'activation des deux sous-populations de lymphocytes T, puisque la réponse des deux types de lymphocytes T est bien différente l'une de l'autre. Dans cette optique, la liaison de la molécule B7.2 avec le CD28, tous deux exprimés sur les lymphocytes T CD8⁺, conduirait à la prolifération et à

la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques, suite à la liaison de ces derniers avec des peptides du soi de faible affinité pour le TCR.

Plusieurs voies s'ouvrent à nous dans la poursuite de ces études. Une première serait de déterminer pourquoi les lymphocytes T CD4⁺ sont plus efficaces que les lymphocytes T CD8⁺ dans l'élimination des lymphocytes B et quel moyen ces lymphocytes T utilisent pour induire l'apoptose des lymphocytes B. Une autre question importante serait de déterminer comment les lymphocytes T CD4⁺ immunorégulateurs jouent leur rôle dans la tolérance périphérique des cellules CD8⁺.

5. Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier particulièrement le Dr. Sylvie Fournier pour son support tout au long de l'exécution de mon projet de recherche, et pour les nombreux conseils et suggestions qu'elle m'a apportés. Je tiens aussi à mentionner mon appréciation envers le temps qu'elle a investi en moi et la confiance qu'elle m'a donné tout au long de ma maîtrise. Je ne pourrai jamais te rendre tout ce que tu m'as donné Sylvie, mais je veux simplement te remercier de tout coeur.

J'aimerais également remercier tous les professeurs du département d'immunologie, Dr Jana Stankova, Dr Claire Dubois, Dr Gilles Dupuis, Dr Marek Rola-Pleszcznski et Dr Patrick McDonald pour la façon dont vous communiquez votre intérêt envers la science à l'intérieur de vos cours, des présentations et des discussions. J'ai vraiment apprécié les deux années passées en votre présence.

J'aimerais aussi remercier tous mes collègues de laboratoire, Alexandre Blanchette mon partenaire de Volleyball, Marcel Brisebois le comique de service, les stagiaires Josée, Geneviève et Jonathan, pour le plaisir que j'ai eu à travailler avec vous et la bonne ambiance qui a régné dans le laboratoire durant ces deux années. J'aimerais également remercier tous les autres étudiants que j'ai côtoyés, pour les bonnes discussions que nous avons entretenues.

Finalement, mes derniers mercis vont à ma famille qui m'ont encouragé depuis mon jeune âge dans mes études et à ma femme que j'aime beaucoup, pour avoir toujours cru en ma réussite, pour m'avoir appuyé dans les moments de tous les jours, puisque comme on le sait, la vie ne se limite pas au temps passé en classe ou dans un laboratoire.

6. Annexe 1.

Anticorps	Clone	Concentration (mg/ml)	Quantité (μ l)	Compagnie
Anti-Hamster FITC		0.7	1	Caltag lab.
SA-FITC		1	1.5	Caltag lab.
SA- PE		0.3	2.5	Caltag lab
SA-Cyc		0.5	0.5	Pharmingen.
B7.2 FITC	GL1		2.5	
B7.2 PE	RMMP-1		2	Cederlane
B220 FITC	RA3-6B2	0.2	2	Gibco
B220 PE	RA3-6B2	0.1	3	Cederlane
CD4 FITC	H129.19	0.25	0.7	Gibco
CD4 PE	RM4-4	0.5	1	Pharmingen
CD8 FITC	53-6.7	0.5	1	Pharmingen
CD8 PE	53-6.7	0.25	0.7	Gibco
CD23 FITC	B3B4	0.5	1	Pharmingen
CD25-biotine	7D4	0.5	1	Pharmingen
CD28	37N	1	1	
CD44-biotine	Im7	0.5	0.5	Pharmingen
CD45RB- biotine	16A	0.5	0.5	Pharmingen

Anticorps	Clone	Concentration (mg/ml)	Quantité (μl)	Compagnie
CD62-L-biotine	MEL-14	0.1	3	Cederlane
CD69-biotine	Y245	0.5	0.5	Pharmingen
IL-2R β FITC	TM-B1	0.5	1	Pharmingen
CTLA-4 PE	UC10-4F10-11	0.5	2	Pharmingen
INF γ FITC	XMG1.2	0.5	0.5	Pharmingen
IgM biotine	11/41	0.5	1	Pharmingen
V β s FITC			20	Pharmingen

7. Références

Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F : **An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation.** *J. Exp. Med.* 1999, **190** :995-1004.

Austrup F, Vestwber D, Borges E, Lohning M, Brauer R, Renz H, Hallmann R, Scheffold A, Radbruch A, Hamann A : **P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues.** *Nature* 1997, **385** :81-83.

Azuma M, Yssel H, Phillips JH, Spits H, Lanier LL : **Functional expression of B7/BB1 on activated T lymphocytes.** *J. Exp. Med.* 1993, **177** :845-850.

Balzano C, Buonavista N, Rouvier E, Golstein P : **CTLA-4 and CD28 : similar proteins, neighbouring genes.** *Int. J. Cancer.* 1992, **7** :28-32.

Berke G : **The CTL's kiss of death.** *Cell* 1995, **81** :9-12.

Beverly B, Kang SM, Lenardo MJ, Scharz RH : **Reversal of *in vitro* T cell clonal anergy by IL-2 stimulation.** *Int. Immunol.* 1992, **4** :661

Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, Thompson CB : **CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL.** *Immunity* 1995, **3** :87-98.

Brabb T, Dassow P, Odonez N, Schnabel B, Duke B, Goverman J : **In situ tolerance within the central nervous system as a mechanism for preventing autoimmunity.** *J Exp Med.* 2000, **192**:871-80.

Brocker T : **Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cell.** *J. Exp. Med.* 1997, **186** :1223-1232.

Brocker T : **The role of dendritic cells in T cell selection and survival.** *J. Leukoc. Biol.* 1999, **66** :331-335.

Browne KA, Blink E, Sutton VR, Froelich CJ, Jans DA, Trapani JA : **Cytosolic delivery of granzyme B by bacterial toxins : evidence that endosomal disruption, in addition to transmembrane pore formation, is an important function of perforin.** *Mol. Cell. Biol.* 1999, **19** :8604-8615.

Carson JM, Reilley CR, Sutcliffe JG, Lo D : **Disproportionate recruitment of CD8+ T cells into the central nervous system by professional antigen-presenting cells.** *Am. J. Pathol.*,1999 **154** :481-494.

Cederbom L, Hall H, Ivars F : **CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells down-regulate costimulatory molecules on antigen-presenting cells.** *Eur. J. Immunol.* 2000, **30** :1538-1543.

Chace JH, Cowdery JS, Field EH : **Effect of anti-CD4 on CD4 subsets.** *J. Immunol.* 1994, **152** :405-412.

Chambers CA, Sullivan TJ, Allison JP : **Lymphoproliferation in CTLA-4-deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4⁺ T cells.** *Immunity* 1997, **7** :885-895.

Chambers CA, Sullivan TJ, Truong T, Allison JP : **Secondary but not primary T cell responses are enhanced in CTLA-4-deficient CD8⁺ T cells.** *Eur. J. Immunol.* 1998, **28** :3137-3143.

Chambers CA, Kuhns MS, Allison JP : **Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) regulates primary and secondary peptide-specific CD4⁺ T cell responses.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999, **96** :8603-8608.

Cosgrove D, Gray D, Dierich A, Kaufman J, Lemeur M, Benoist C, Mathis D : **Mice lacking MHC class II molecules.** *Cell.* 1991, **66** :1051-1066.

Dahl AM, Klein C, Andres PG, London CA, Lodge MP, Mulligan RC, Abbas AK : **Expression of Bcl-X (L) restores cell survival, but not proliferation and effector differentiation, in CD28-deficient T lymphocytes.** *J. Exp. Med.* 2000, **191** :2031-2038.

Dutton RW, Bradley LM, Swain SL : **T Cell Memory.** *Ann. Rev. Immunol.* 1998, **16** :201-223.

Ernst B, Lee D-S, Chang JM, Sprent J, Surh CD : **The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery.** *Immunity* 1999, **11** :173-181.

Farrar MA, Schreiber RD : **The molecular cell biology to interferon gamma and its receptor.** *Ann. Rev. Immunol.* 1993, **11** :571-611.

Farris AD, Keech CL, Gordon TP, McCluskey J : **Epitope mimics and determinant spreading : pathways to autoimmunity.** *Cell. Mol. Life. Sci.* 2000, **57** :569-578.

Fournier S, Rathmell JC, Goodnow CC, Allison JP : **T cell-mediated elimination of B7.2 transgenic B cells.** *Immunity* 1997, **6** :327-339.

Fraser JD , Weiss A : **Regulation of T-cell lymphokine gene transcription by the accessory molecule CD28.** *Mol. Cell. Biol.* 1992, **12** :4357-4363.

Freeman GJ, Lombard DB, Gimmi CD, Brod SA, Lee K, Laning JC, Hafler DA, Dorf ME, Gray GS, Reiser H, June CH, Thompson CB, Nadler LM : **CTLA-4 and CD28 mRNA are coexpressed in most T cells after activation.** *J. Immunol.* 1992, **149** :3705

Freeman GJ, Borriello F, Hodes RJ, Reiser H, Gribben JG, Ng JW, Kim J, Goldberg JM, Hathcock K, Laszlo G, Lombard LA, Wang S, Gray GS, Nadler LM, Sharpe AH : **Murine B7.2 an alternative CTLA-4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production.** *J. Exp. Med.* 1993, **178** :2185-2192.

Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA, NG JW, Restivo VA, Lombard Jr. LA, Gray GS, Nadler LM. **Cloning of B7-2 : a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation.** *Science* 1993, **262** :909-911.

Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Sugita K, Freedman AS, Morimoto S, Nadler LM : **B-cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin-2.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, **88** :6575-6579.

Goldrath AW, Bevan MJ : **Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8⁺ T cells in lymphopenic hosts.** *Immunity* 1999, **11** :183-190.

Goldrath AW, Bogtzki LY, Bevan MJ : **Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation.** *J. Exp. Med.* 2000, **192** :557-564.

Grakoui A, Brownley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML : **The immunological Synapse :A molecular machine controlling T cell activation.** *Science* 1999, **285** :221-227.

Greenfield EA, Howard E, Paradis T, Nguyen K, Benazzo F, Mclean P, Höllsberg P, Davis G, Hafler DA, Sharpe AH, Freeman GJ, Kuchroo VK : **B7.2 expressed by T cells does not induce CD28-mediated costimulatory activity but retains CTLA4 binding.** *J. Immunol.* 1997, **158** : 2025-2034.

Greenfield EA, Nguyen KA, Kuchroo VK : **CD28/B7 costimulation : a review.** *Crit. Rev. Immunol.* 1998, **18** : 389-418.

Gross JA, St-John T, Allison JP : **The murine homologue of the lymphocytes antigen CD28 molecular cloning and cell surface expression.** *J. Immunol.* 1990, **144** :3201-3210.

Grusby MJ, Randall SJ, Papaioannou VE, Glimcher LH : **Depletion of CD4⁺ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice.** *Science* 1991, **253** :1417-1421.

Hakamada-Taguchi R, kato T, Ushijima H, Murakami M, Uede T, Nariuchi H : **Expression and co-stimulatory function of B7.2 on murine CD4⁺ T cells.** *Eur. J. Immunol.* 1998, **28** :865-873.

Harris NL, Ronchese F : **The role of B7 costimulation in T-cell immunity.** *Immunol. and Cell Biol.* 1999, **77** :304-311.

Hathcock Ks, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ : **Comparative analysis of B7.1 and B7.2 costimulatory ligands : expression and function.** *J. Exp. Med.* 1994, **180** :631-640.

Heath VL, Saoudi A, Seddon BP, Moore NC, Fowell DJ, Mason DW : **The role of the thymus in the control of autoimmunity.** *J. Autoimmun.* 1996, **9** :241-246.

Höllsberg P, Scholz C, Anderson DE, Greenfield EA, Kuchroo VK, Freemanb GJ, Hafler DA : **Expression of a hypoglycosylated form of CD86 (B7.2) on human T cells with altered binding properties to CD28 and CTLA-4.** *J. Immunol.* 1997, **159** :4799-4805.

Hwang I, Huang J-F, Kishimoto H, Brunmark A, Peterson PA, Jackson MR, Surh CD, Cai Z, Sprent J : **T cells can use either T cell receptor or CD28 receptors to absorb and internalize cell surface molecules derived from antigen-presenting cells.** *J. Exp. Med.* 2000, **191** :1137-1148.

Janeway CA, Kupfer A, Viret C, Boursalian T, Goverman J, Bottomly K, Sant'Angelo D : **T-cell development survival, and signaling a new concept of the role of self-peptide : self-MHC complexes.** *Immunologist* 1998, **6** :5-12.

Jeannin P, Delneste Y, Lecoanet-Henchoz S, Gauchat J-F, Ellis J, Bonnefoy J-Y. **CD86 (B7.2) on human B cells : a functional role in proliferation and selective differentiation into IgE- and IgG4- producing cells.** *J. Biol. Chem.* 1997, **272** :15613-15619.

June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB : **The B7 and CD28 receptor families.** *Immunol. Today* 1994, **15** :321-331.

Karlsen AE, Dyrberg T : **Molecular mimicry between non-self, modified self and self in autoimmunity.** *Semin. Immunol.* 1998, **10** :25-34.

Kasprowicz DJ, Kohm AP, Beron MT, Chruscinski AJ, Sharpe A, Sanders VM : **Stimulation of the B cell recepteur, CD86 (B7.2), and the β_2 -adrenergic receptor intrinsically modulates the level of IgG1 and IgE produced per B cell.** *J. Immunol.* 2000, **165** :680-690.

Kleijmeer MJ, Escola JM, UytdeHaag FG, Jakobson E, Griffith JM, Osterhaus AD, Stoorvogel W, Melief CJ, Rabouille C, Geuze HJ : **Antigen loading of MHC class I molecules in the endocytic tract.** *Traffic* 2001, **2** :124-137.

Ku CC, Murakami M, Sakamoto A, Kappler J, Marrack P : **Control of homeostasis of CD8⁺ Memory T cells by opposing cytokines.** *Science* 2000, **288** : 675-678.

LaSalle JM, Hafler DA : **T cell anergy.** *FASEB. J.* 1994, **8** :601-608.

Lenshow DJ, Walunas TL, Bluestone JA : **CD28/B7 system of the T cell costimulation.** *Annu. Rev. Immunol.* 1996, **14** :233-258.

Leung HT, Bradshaw J, Cleaveland JS, Linsley PS : **Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4, a high avidity receptor for CD80 and CD86, contains an intracellular localization motif in its cytoplasmic tail.** *J. Biol. Chem.* 1995, **270** :25107-25114.

Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA : **Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin-2 mRNA accumulation.** *J. Exp. Med.* 1991, **173** : 721-730.

Linsley PS, Bradshaw J, Urnes M, Grosmaire L, Ledbetter JA : **CD28 engagement by B7/BB-1 induces transient down-regulation of CD28 synthesis and prolonged unresponsiveness to signaling.** *J. Immunol.* 1993, **150** :3161-3169.

Loder F, Mutschler B, Ray RJ, Paige CJ, Sideras P, Torres R, Lamers MC, Carsetti R : **B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals.** *J. Exp. Med.* 1999, **190** :75-89.

Lodoice JP, Boone DL, Chai S, Swain RE, Dassopoulos T, Trettin S, Ma A : **IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation.** *Immunity* 1998, **9** :669-676.

Malissen B : **Dancing the immunological two-step.** *Science* 1999, **285** :207-208.

Mueller DL Jenkins MK, Shchwartz RH : **Clonal expansion versus functional clonal inactivation : A costimulatory signaling pathway determines the outcome of T cellantigen receptor occupancy.** *Annu. Rev. Immunol.* 1989. **7** :445-480.

Murali-Krishna K, Ahmed R : **Naive T cells masquerading as memory cells.** *J. Immunol.* 2000, **165** : 1733-1737.

Nagata S, Golstein P : **The Fas death factor.** *Science* 1995, **267** :1449-1456.

Norbury CC, Princiotta MF, Bacik I, Bruthkiewicz RR, Wood P, Elliott T, Bennink JR, Yewdell JW : **Multiple antigen-specific processing pathways for activating naive CD8⁺ T cells in vivo.** *J. Immunol.* 2001, **166** :4355-4362.

Oehen S, Feng L, Xia Y, Surh CD, Hedrick SM : **Antigen comportsentation and T helper cell tolerance induction.** *J. Exp. Med.* 1996, **183** :2617-2626.

Ohashi PS, Oehen S, Buerki K, Pireher H, Ohashi CT, Odermatt B, Malissen B, Zinkernagel RM, Hengartner H : **Ablation of « tolerance » and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice.** *Cell* 1991, **65** :305-317.

Opferman JT, Ober BT, Ashton-Rickardt PG : **Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes.** *Science* 1999, **283** :1745-1748.

Powrie F, Carlino J, Leach MW, Mauze S, Coffman RL : **A critical role for transforming growth factor β but not interleukine 4 on the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB^{low} CD4⁺T cells.** *J. Exp. Med.* 1996, **183** :2669-2674.

Prabhu Das MR, Zamvil SS, Borriello F, Weinwr HL, Sharpe AH, Kuchroo VK : **Reciprocal expression of co-stimulatory molecules , B7.1 and B7.2, on murine T cells following activation.** *Eur. J. Immunol.* 1995, **25** : 207-211.

Rolink, A.G., Andersson, J., and Melchers, F.. **Characterization of immature B cells by a novel monoclonal antibody, by turnover and by mitogen reactivity.** *Eur. J. Immunol.* 1998, **28**:3738-3748.

Sabzevari H, Kantor J, Jaigirdar A, Tagaya Y, Naramura M, Hodge JW, Berne J, Schlom J : **Acquisition of CD80 (B7.1) by T cells.** *J. Immunol.* 2001, **166** :2505-2513.

Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA : **B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of CD4⁺ CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes.** *Immunity* 2000, 12 :431-440.

Samson DM : **CD28, CTLA-4 and their ligands : who does what and to whom?** *Immunology* 2000, 101 :169-177.

Schwartz RH : **A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy.** *Science* 1990, 248 :1349-1352.

Schweitzer AN, Sharpe AH : **Mutual regulation between B7.1 (CD80) expressed on T cells and IL-4.** *J. Immunol.* 1999, 163 :4819-4825.

Shevach EM, **Regulatory T cells in autoimmunity,** *Ann. Rev. Immunol.* 2000, 18 :423-449.

Shi L, Kraut RP, Aebersold R, Greenberg AH : **A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis.** *J. Exp. Med.* 1992, 175 :553-566.

Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S : **Induction of tumor immunity by removing CD25⁺ CD4⁺ T cells : A common basis between tumor immunity and autoimmunity.** *J. Immunol.* 1999, 163 :5211-5218.

Shuford WW, Klussman K, Trichler DD, Loo DT, Chalupny J, Siadak AW, Brown TJ, Emswiler J, Raecho H, Larsen CP : **4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8⁺T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses.** *J. Exp. Med.* 1997, **186** :47-55.

Seifken R, Klein-Hebling S, Serfling E, Kurrle R, Schwinzer R : **A CD28-associated signaling pathways leading to cytokine gene transcription and T cell proliferation without TCR engagement.** *J. Immunol.* 1998, **161** :1645-1651.

Sperling AI, Bluestone JA. **The complexities of T-Cell co-stimulation : CD28 and beyond.** *Immunological Reviews* 1996, **153** :155-182.

Stockinger B : **T lymphocyte tolerance : From thymic deletion to peripheral control mechanisms.** *Adv. Immunol.* 1999, **71** :229-265.

Stout RD : **Macrophage activation by T cells : cognate and non-cognate signals.** *Curr. Opin. Immunol.* 1993, **5** :398-403.

Surh CD, Sprent J : **Homeostatic T cell proliferation : How far can T be activated to self-ligands.** *J. Exp. Med.* 2000, **192** :F9-F14.

Takahashi T, Tagami S, Yamazaki T, Uede J, Shimizu N, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S : **Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4.** *J. Exp. Med.* 2000, **192** : 303-310.

Tanchot C, Lemonnier FA, Pérarnau B, Freitas AA, Rocha B : **Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naïve or memory T cells.** *Science* 1997, **276** :2057-2062.

Thompson CB, Lindsten T, Ledbetter JA, Kunkel SL, Young HA, Emerson SG, Leiden JM, June CH : **CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines** : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, **86** :1333-1337.

Thorton AM, Shevach EM : **CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production.** *J. Exp. Med.* 1998. **188** :287-296.

Tisch R, McDevitt H :**Insulin-dependent diabetes mellitus.** *Cell.* 1996, **85** :291-297.

Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH : **Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of the CTLA-4.** *Immunity* 1995, **3** :541-546.

Valitutti S, Muller S, Cella M, Padovan E, Lanzavecchia A : **Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes.** *Nature* 1995, **375** :148-151.

Van Parijs L, Sethna MP, Schweitzer N, Borriello F, Sharpe AH, Abbas AK : **Functional consequences of dysregulated B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression in B or T lymphocytes of transgenic mice.** *J. Immunol.* 1997, **159** :5336-5344.

Veiga-Fernandes H, Walter U, Bourgeois C, Mclean A, Rocha B : **Response of naïve and memory CD8⁺ T cells to antigen stimulation *in vivo*.** *Nature Immunol.* 2000, **1** :47-53.

Von Boehmer H : **Thymic selection :a matter of life and death.** *Immunol. Today.* 1992, **13** :454-458.

Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW : **Lymphoproliferation disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4.** *Science* 1995, **270** :985-988.

Waterhouse P, Manrengère LE, Mittrücker H-W, Mak TW : **CTLA-4, a negative regulator of T-lymphocyte activation.** *Immunological Reviews* 1996, **153** :183-207.

Watts TH, DeBenedette MA : **T cell co-stimulatory molecules other than CD28.** *Curr. Opin. Immunol.* 1999, **11** :286-293.

Watts C, Powis S : **Pathways of antigen processing and presentation.** *Rev. Immunogenet.* 1999, 1 :60-74.

Westermann J, Pabst R : **How organ-specific is the migration of « naive » and « memory » T cells?** *Immunol. Today.* 1996, 17 : 278-282.

Yu X, Fournier S, Allison JP, Sharpe AH, Hodes RJ :**The role of B7 costimulation in CD4/CD8 T cell homeostasis.** *J. Immunol.* 2000, 164 :3543-3553.

Zhai Y, Kupiec-Weglinski JW : **What is the role of regulatory T cells in transplantation tolerance?** *Curr. Opin. Immunol.* 1999, 11 :497-503.

Zijlstra M, Bix M, Simister NE, Loring JM, Raulet DH, Jaenisch R : **Beta-microbulin deficient mice lack CD4-CD8+ cytotoxic T cells.** *Nature* 1990, 344 :742-746.